



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# **Análisis funcional de la senescencia en *Petunia hybrida* orientada al mejoramiento del cultivo**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Lic. Francisco Horacio Astigueta**

Director de tesis: Dra. Paula Fernández

Co-Director: Dr. Santiago Ariel Trupkin

Consejero de estudios: Dra. Ruth Amelia Heinz

Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, INTA-CONICET

Instituto de Floricultura, INTA

CICVyA, Castelar, Buenos Aires, marzo 2020

## Trabajos publicados durante la tesis:

Mariana Cecilia Pérez de la Torre, Paula Fernández, Julián Alejandro Greppi, María Andrea Coviella, Martín Nicolás Fernández, **Francisco Astigueta**, Diego Alejandro Mata and Santiago Ariel Trupkin (2018). Transformation of *Mecardonia* (*Plantaginaceae*) with wild-type *Agrobacterium rhizogenes* efficiently improves compact growth, branching and flower related ornamental traits. *Scientia Horticulturae*. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.047>

Santiago A. Trupkin\*, Francisco **H. Astigueta\***, Amilcar H. Baigorria, Martín N. García, Verónica C. Delfosse, Sergio A. González, Mariana Cecilia Pérez de la Torre, Sebastián Moschen, Verónica V. Lía, Paula Fernández, and Ruth A. Heinz. (\***autores con asterisco comparten primera autoría**). Identification and expression analysis of NAC transcription factors potentially involved in leaf and petal senescence in *Petunia hybrida* (2019). *Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110195>

Bengoa Luoni, Sofia\*, **Astigueta, Francisco\***, Nicosia, Salvador., Moschen, Sebastian., Fernandez Paula. and Heinz, Ruth A. (\***autores con asterisco comparten primera autoría**). Transcription Factors Associated to Leaf Senescence In Crops (2019). *Plants*. <https://doi.org/10.3390/plants8100411>

Sebastián Moschen, Johanna Marino, Salvador Nicosia, **Francisco H. Astigueta**, Janet Higgins, Saleh Alseekh, Sofia Bengoa Luoni, Máximo Rivarola, Alisdair R. Fernie, Nicolas Langlade, Norma Paniago, Paula Fernández and Ruth A. Heinz. System biology approach applied to gene finding and metabolic pathways identification for leaf senescence in sunflower (2019) *BMC Plant Biology*. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2021-6>

## INDICE

Resumen .....	1
Abstract .....	2
Agradecimientos.....	3
INTRODUCCIÓN .....	4
<i>Petunia hybrida</i> : generalidades, importancia económica y utilización como modelo experimental .....	4
El proceso de senescencia foliar.....	5
Evolución y desarrollo del proceso de senescencia foliar .....	6
Factores que influyen en el proceso de senescencia foliar.....	7
Eventos moleculares asociados al proceso de senescencia foliar.....	12
Expresión génica durante la senescencia foliar.....	14
Factores de transcripción asociados a la senescencia .....	16
El proceso de senescencia floral.....	20
HIPÓTESIS .....	23
OBJETIVOS .....	24
Objetivo General .....	24
Objetivos específicos.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
1. Material vegetal y condiciones de cultivo para la caracterización de la senescencia foliar y de los pétalos en <i>P. hybrida</i> .....	25
2. Análisis de parámetros fisiológicos y moleculares relacionados con el avance de la senescencia foliar y de los pétalos en <i>P. hybrida</i> .....	26
3. Extracción de ARN y síntesis de ADN copia .....	27
4. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	27
5. Identificación de factores de transcripción NAC y WRKY asociados a la senescencia en <i>P. hybrida</i> .....	29
6. Alineamientos y análisis filogenéticos de las proteínas NAC y WRKY .....	29
7. Generación de <i>Clusters</i> y <i>Heatmaps</i> para el análisis de los patrones de expresión de genes <i>PhNAC</i> y <i>PhWRKY</i> en petunia.....	30
8. Construcción de plásmidos para transformación de <i>P. hybrida</i> cv Mitchell Diploid.....	30
9. Transformación de <i>P. hybrida</i> y confirmación de sobre-expresión y silenciamiento génico de genes candidatos de la familia <i>NAC</i> .....	31
10. Análisis de la senescencia foliar y de pétalos en las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de <i>PhNAC024</i> y <i>PhNAC017</i> .....	32

11. Análisis de parámetros morfológicos y tiempo a floración en las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de <i>PhNAC024</i> y <i>PhNAC017</i> .....	33
12. Análisis de las tasas fotosintéticas en las hojas y parámetros asociados al rendimiento en las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de <i>PhNAC024</i> .....	33
13. Análisis preliminares de senescencia inducida por oscuridad y agregado exógeno de ABA en las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de <i>PhNAC024</i> .....	34
14. Análisis estadístico.....	34
RESULTADOS.....	35
CAPÍTULO 1.....	35
Estudio de la progresión de la senescencia foliar y de los pétalos en <i>P. hybrida</i> a través de la cuantificación de parámetros fisiológicos y moleculares .....	35
CAPÍTULO 2.....	39
Búsqueda y selección de genes asociados a la senescencia de las familias <i>NAC</i> y <i>WRKY</i> en <i>P. hybrida</i> .....	39
CAPÍTULO 3.....	49
Análisis de expresión de genes <i>PhNAC</i> y <i>PhWRKY</i> en tres procesos de senescencia en <i>P. hybrida</i> .....	49
Análisis <i>heatmap</i> para determinar la participación simultánea de los genes <i>PhNAC</i> y <i>PhWRKY</i> en los tres procesos de senescencia .....	54
Análisis filogenéticos y construcción de grupos funcionales comparativos de miembros <i>NAC</i> y <i>WRKY</i> asociados a la senescencia .....	57
Selección de genes candidatos asociados a la senescencia de las familias <i>NAC</i> y <i>WRKY</i> en <i>P. hybrida</i> .....	62
CAPÍTULO 4.....	67
Análisis funcional de dos genes candidatos de la familia <i>NAC</i> , <i>PhNAC024</i> y <i>PhNAC017</i> , a través de la generación de plantas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento génico .....	67
Generación de plantas transgénicas .....	67
Evaluación de plantas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento génico de <i>PhNAC024</i> .....	68
Estudios fisiológicos y moleculares asociados al avance de la senescencia foliar en líneas de sobre-expresión y silenciamiento de <i>PhNAC024</i> .....	69
Estudios fisiológicos y moleculares asociados al avance de la senescencia en los pétalos de las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de <i>PhNAC024</i> .....	78
Análisis de las tasas fotosintéticas y rendimiento en las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de <i>PhNAC024</i> .....	82
Estudios preliminares asociados a la senescencia foliar inducida por oscuridad y ABA exógeno en las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de <i>PhNAC024</i> .....	85
Evaluación de la senescencia en plantas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento génico de <i>PhNAC017</i> .....	88

Estudios fisiológicos asociados al avance de la senescencia foliar en líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de <i>PhNAC017</i> .....	89
Estudios fisiológicos y moleculares asociados al avance de la senescencia en los pétalos de las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de <i>PhNAC017</i> .....	91
DISCUSIÓN.....	95
Estudio de la progresión de la senescencia foliar y floral en <i>P. hybrida</i> a través de la cuantificación de parámetros fisiológicos y moleculares.....	95
Búsqueda y selección de genes asociados a la senescencia de las familias <i>NAC</i> y <i>WRKY</i> en <i>P. hybrida</i> .....	98
Análisis de expresión de genes <i>PhNAC</i> y <i>PhWRKY</i> en tres procesos de senescencia .....	99
Selección de genes candidatos asociados a la senescencia de las familias <i>NAC</i> y <i>WRKY</i> en <i>P. hybrida</i> .....	102
<i>PhNAC024</i> y su rol como regulador de la senescencia foliar en <i>P. hybrida</i> .....	112
<i>PhNAC024</i> y su rol como regulador de la senescencia en los pétalos de <i>P. hybrida</i> .....	121
<i>PhNAC017</i> y su rol como regulador de la senescencia en los pétalos de <i>P. hybrida</i> .....	124
CONCLUSIONES .....	126
ANEXOS.....	127
BIBLIGRAFÍA.....	141

# **Análisis funcional de la senescencia en *Petunia hybrida* orientada al mejoramiento del cultivo**

## **Resumen**

El proceso de senescencia foliar en plantas es un mecanismo complejo controlado por múltiples variables genéticas y ambientales que puede afectar el rendimiento de los cultivos. En los pétalos, la polinización es normalmente la señal externa que acelera la senescencia, mientras que en su ausencia depende principalmente de señales endógenas asociadas a la edad. *Petunia hybrida* es una de las plantas ornamentales con mayor relevancia económica a nivel mundial, donde el retraso de la senescencia tanto en hojas como en pétalos representan características buscadas por los mejoradores. El objetivo del proyecto fue identificar factores de transcripción candidatos de participar en la regulación de la senescencia foliar y de los pétalos en *Petunia*. Partiendo de factores de transcripción de las familias NAC y WRKY que mostraron cambios de expresión durante la senescencia foliar en *Arabidopsis*, caracterizamos los perfiles de expresión de los putativos ortólogos en *P. hybrida* en distintos tipos de senescencia que ocurren en hojas y pétalos. En conjunto con análisis fisiológicos y filogenéticos comparativos, se seleccionaron candidatos fuertes a regular dichos procesos en *petunia*. Estudios funcionales en líneas transgénicas de dos genes NAC candidatos, *PhNAC024* y *PhNAC017*, permitieron determinar que ambos factores de transcripción actúan como reguladores positivos de la senescencia en las hojas y/o en los pétalos. El presente proyecto sienta las bases para la obtención de cultivares comerciales de *petunia* con senescencia retrasada, mediante la generación a futuro de mutaciones dirigidas de pérdida de función para los genes identificados.

Palabras Clave: *Petunia hybrida*; Factores de transcripción; Senescencia foliar, Senescencia floral, Perfiles de expresión, Mejoramiento genético.

# Functional analysis of senescence in *Petunia hybrida* aimed at crop improvement

## Abstract

Progression of leaf senescence is a complex mechanism controlled by several genetic and environmental factors that may affect crop yields. In flowers, pollination acts as the main signal accelerating petal senescence, but in its absence, senescence is delayed and depends mainly on age-related signals. *Petunia hybrida* is an important economical ornamental crop used worldwide where delayed leaf and petal senescence are characteristics highly appreciated by ornamental breeders. In this work, we identify transcription factors governing leaf and petal senescence in petunia. Starting from transcription factors of the NAC and WRKY families that showed expression changes during leaf senescence in *Arabidopsis*, we characterized the expression profiles of their putative orthologues in *P. hybrida* in different types of senescence occurring in leaves and petals. Together with physiological and phylogenetic comparative analysis, we selected strong candidate genes for fine-tuning senescence in petunia. *PhNAC024* and *PhNAC017* were selected for functional analysis performed with overexpressing and silencing transgenic lines. Results reveals that both transcription factors act as positive leaf and/or petal senescence regulators in petunia. The present project sets the groundwork for the future generation of new petunia cultivars with delayed senescence trait through molecular breeding techniques of identified genes.

**Key words:** *Petunia hybrida*; transcription factors, leaf senescence, petal senescence, expression profiles, molecular breeding.

## **Agradecimientos**

A mis viejos por darme la oportunidad de estudiar y estar siempre presentes en cualquier situación. Su ejemplo en el día a día es lo que más me motiva para seguir avanzando y creciendo como persona.

A Santi, gracias por guiarme todos estos años, por enseñarme y transmitirme tu pasión por la ciencia y el trabajo. Un ejemplo de científico, de amigo y por sobre todo una excelente persona.

A Paula, gracias por guiarme, acompañarme y estar siempre bien dispuesta para dar una mano, con palabras de aliento cuando las cosas se ponían duras. Sabes ver lo simple cuando las cosas parecen complejas, sin duda una gran cualidad.

A los amigos del laboratorio: Seba, Moni, Salva, Juan, Agus, Naty, Sofi, Charly, “la polaca” y Andre y todos los que seguramente me estaré olvidando. Gracias por darme una mano en todo lo que necesitaba y por hacer que el día a día en la mesada sea una excelente experiencia.

A Vero, gracias por tu paciencia y por enseñarme las cosas con tanta alegría y buena onda. Gran parte de este trabajo fue gracias a tu ayuda.

A Juancito y Martin, por acompañarme en todos los almuerzos.

A los chicos de Leloir, Steve, Juli, Majo y Marcelo, que me siguen acompañando y guiando desde mis inicios en la ciencia.

A Ceci, gracias por bancarme en la recta final, acompañándome y transmitiéndome paz y tranquilidad cuando lo necesitaba. Agradecido de encontrarte y hacerte parte de mi vida.

A todo el personal de campo y de apoyo del Instituto de Floricultura y el Instituto de Biotecnología.

A mi familia y amigos de la vida por estar siempre a mi lado y darme palabras de aliento en momentos difíciles.



## INTRODUCCIÓN

### ***Petunia hybrida*: generalidades, importancia económica y utilización como modelo experimental**

El género *Petunia* pertenece a la familia Solanaceae, el cual comprende plantas herbáceas originarias de Sudamérica. Los cultivares comerciales, así como también algunas líneas de laboratorio, presentan un origen híbrido (denominados *Petunia hybrida*), ya que derivan de cruzamientos entre *P. axillaris* y especies del clado *P. integrifolia*, cuya distribución natural incluye varias provincias del territorio argentino. Actualmente, los cultivares de *P. hybrida* se comercializan en todo el mundo por sus flores de variados colores, tamaños, formas y perfumes. El mercado de este cultivo ornamental se encuentra en constante crecimiento, siendo superior a otros cultivos ornamentales como begonia, viola e impatiens (U.S.D.A, 2019). Según el Censo Hortiflorícola de la provincia de Buenos Aires (2005), el cultivo de petunia superó la producción de plantines de begonia, prímula, y cyclamen con un total de 2,8 millones de macetas. Debido a una serie de ventajas, líneas como *P. hybrida* cv. 'Mitchell' fueron muy utilizadas como sistema vegetal modelo en investigaciones fisiológicas, bioquímicas, genéticas y citogenéticas previas a la utilización de *Arabidopsis thaliana* que, a pesar de su éxito como referente vegetal, no puede representar todos los procesos que ocurren en distintas especies vegetales (Gerats y Vandebussche, 2005). Estas ventajas radican en un ciclo de vida corto, facilidad de cultivo, propagación asexual y sexual, las características de sus hojas y el tamaño de sus flores, la facilidad para ser transformada y la disponibilidad de herramientas moleculares disponibles como mapas genéticos, ESTs, microarreglos de ADN y ARN-seqs. Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento han permitido secuenciar una serie de transcriptomas, así como los genomas de los parentales de *P. hybrida*, convirtiendo al género en un renovado modelo genético comparativo que ayudará a entender las bases moleculares y el origen de la diversidad en los procesos del desarrollo (Bombarely *et al.*, 2016; Vandebussche *et al.*, 2016). Conjuntamente, la tecnología CRISPR/Cas9 fue recientemente puesta a punto en petunia, la cual permitirá la edición y el consecuente análisis funcional de genes candidatos, contribuyendo al mejoramiento y a una rápida liberación de cultivares novedosos al mercado al no ser considerados transgénicos luego de una selección apropiada (Shan *et al.*, 2013; Waltz, 2016). Además, el género está filogenéticamente emparentado con *Calibrachoa* y con otros cultivos de interés agronómico de la familia Solanaceae (papa, tomate, pimiento, berenjena, tabaco), por los que los avances generados en petunia podrían ser aplicados a otras especies de la familia.

## El proceso de senescencia foliar

El proceso de senescencia foliar en plantas es un mecanismo complejo controlado por múltiples factores genéticos y ambientales. Es el último estadio del desarrollo de las hojas que puede ser inducido por la edad, los niveles de hormonas reguladoras de crecimiento y el inicio del desarrollo reproductivo (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Guo y Gan, 2005). No obstante, en condiciones de estrés biótico o abiótico (por ej. elevadas temperaturas, sequía, deficiencia de nutrientes, insuficiencias de luz e infecciones por patógenos), el proceso puede iniciarse de forma prematura (Guo y Gan, 2005). La senescencia de la hoja se caracteriza por una declinación de la actividad fotosintética, una activa degeneración de las estructuras celulares, el reciclado de nutrientes, y en última instancia, la muerte celular (Navabpour *et al.*, 2003). La determinación de su inicio es compleja ya que no existe un síntoma que indique este momento y los parámetros visuales que normalmente se asocian con la senescencia resultan tardíos para evaluar la evolución del proceso. Tanto la variación en el contenido de clorofila, como el amarillamiento de las hojas, son detectables mucho tiempo después de que la cascada de señalización del proceso se activa. Si bien los síntomas de la senescencia han sido explorados, los procesos involucrados y los mecanismos moleculares que la controlan aún no son bien comprendidos (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Durante la senescencia, las macromoléculas como proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos, son degradados y los nutrientes liberados de este catabolismo son activamente translocados a regiones de activo crecimiento que incluyen a los meristemas, hojas jóvenes, frutos y semillas en desarrollo (Butt *et al.*, 1998; Guo y Gan, 2005; Gepstein *et al.*, 2003; Quirino *et al.*, 2000). En cultivos anuales o con senescencia de tipo monocárpica, la senescencia de las hojas se solapa con la fase reproductiva, influenciando el rendimiento de los cultivos cuando es inducida prematuramente por condiciones adversas (Woo *et al.*, 2019). Debido a esto, el proceso adquiere un gran impacto económico por la mayor o menor oportunidad de las plantas en mantener el sistema fotosintéticamente activo por periodos prolongados, especialmente durante la etapa de llenado de granos (Podzimska-Sroka *et al.*, 2015).

Los principales avances en la comprensión molecular de la senescencia han sido logrados a través de la caracterización de plantas mutantes o transgénicas que son capaces de mantener sus hojas activas por períodos de tiempo prolongados (denominadas en inglés: *stay-green*) respecto de las plantas silvestres o control, así como por la caracterización de genes asociados a la senescencia, que han revelado la existencia de una compleja red regulatoria (Kusaba *et al.*, 2013). En el caso de las plantas con fenotipo *stay-green* denominadas “funcionales”, el aparato fotosintético se mantiene activo por períodos prolongados respecto al de plantas control, lo que suele traducirse en una mayor producción de fotoasimilados, mejores características agronómicas y en algunos casos un mayor rendimiento (Kusaba *et al.*, 2013; Luoni *et al.*, 2019; Schippers *et al.*, 2015b). Durante la

senescencia, el aumento en la expresión de genes asociados a los procesos de degradación y removilización de las estructuras celulares es de vital importancia para lograr el eficiente reciclado de nutrientes que, en última instancia, se traducen en un aumento del rendimiento (Chen *et al.*, 2012; Gregersen *et al.*, 2013; Matallana-Ramirez *et al.*, 2013). En este sentido, dependiendo de la especie y la finalidad del retraso de la senescencia, se debe considerar mantener los sistemas de degradación y removilización funcionando de forma eficiente y acoplada (Gregersen *et al.*, 2013).

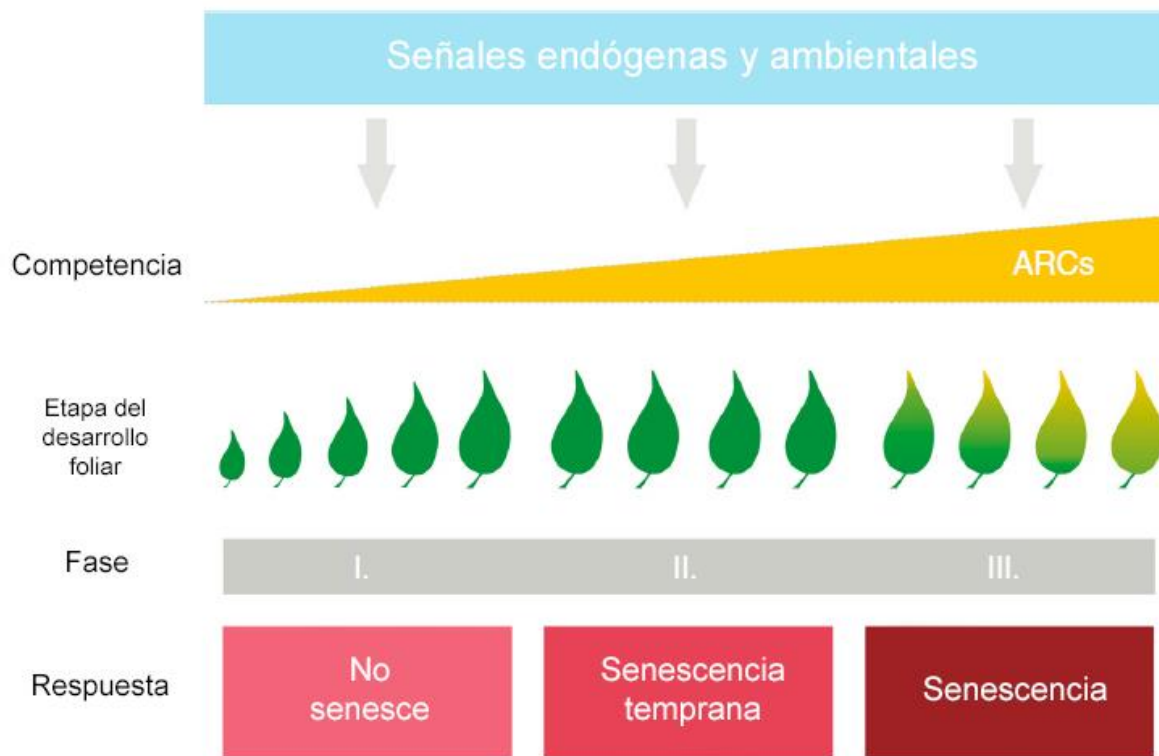
Por otro lado, en plantas con fenotipo *stay-green* “no funcional” o “cosméticas”, la senescencia progresa de forma similar a la de plantas control, sin mantener su sistema fotosintético activo por mayor tiempo, aunque la degradación de la clorofila esta desacoplada del proceso (retraso en su degradación; Hörtensteiner *et al.*, 2009), por lo que no suelen presentar mejoras reales en sus características agronómicas (Kusaba *et al.*, 2013; Schippers, 2015a; Schippers *et al.*, 2015b). En el caso de plantas en donde mantener el verdor de sus hojas es una característica clave de calidad, por ej. en el caso de las plantas ornamentales, la obtención de plantas con fenotipo *stay-green* (funcionales o cosméticas) serían relevantes en la industria florícola.

### **Evolución y desarrollo del proceso de senescencia foliar**

La inducción de la senescencia depende principalmente de la fase del desarrollo foliar. Una hoja joven que no ha alcanzado un grado de madurez determinado, como por ejemplo el final de la expansión de su lámina foliar, suele ser insensible a los estímulos que desencadenan la senescencia (Jing *et al.*, 2002, 2005; Jibrán *et al.*, 2013). Cuando el área foliar es cercana a la máxima expansión y se alcanza cierto grado de madurez, la hoja es capaz de comenzar a percibir señales tanto endógenas como exógenas inductoras de la senescencia. Este concepto se conoce como el modelo de la “ventana de senescencia”, el cual cuenta con tres fases (Fig. 1) (Schippers, 2015a). Durante la primera fase, la hoja experimenta división y expansión celular, por lo tanto, es insensible a señales inductoras de senescencia. En esta fase la hoja en desarrollo funciona como un destino, importando fotoasimilados y nutrientes necesarios para su crecimiento desde las hojas maduras. En la segunda fase, la hoja alcanza su máxima expansión y madurez fisiológica, volviéndose competente o sensible a señales endógenas y exógenas capaces de inducir la senescencia temprana en casos de ambientes desfavorables (Fig. 1). A partir de este momento, la hoja se comporta como una fuente de fotoasimilados y nutrientes hacia otras estructuras en desarrollo. En la tercera fase ocurre la senescencia propiamente dicha, en donde la hoja se encuentra en un estado avanzado de dismantelamiento de estructuras y reciclado activo de los componentes generados. En esta fase, el proceso de senescencia ocurrirá incluso con señales ambientales que sean favorables para su desarrollo (Fig. 1). Por otro lado, y hasta cierto punto de

la senescencia (fase temprana), la hoja tiene la capacidad de percibir señales que retrasen o reviertan su progresión (Jibran *et al.*, 2013; Schippers, 2015a; Schippers *et al.*, 2015b).

El modelo propuesto refleja la importancia evolutiva de este proceso, el cual ocurre en estadios avanzados aun en ambientes favorables, así como la importancia de que las hojas muy jóvenes no puedan ser sometidas a procesos de degradación y reciclado, que sería muy costoso para la planta, aun en condiciones desfavorables (Fig. 1). Mientras que la prioridad de los tejidos jóvenes es crecer y diferenciarse, los tejidos senescentes contribuyen al reciclado de nutrientes y al beneficio de la planta en su conjunto (Graham *et al.*, 2012; Guiboileau *et al.*, 2010; Jibran *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Modelo de la "ventana de senescencia". Figura adaptada de Schippers, (2015a).

### **Factores que influyen en el proceso de senescencia foliar**

Como se mencionó previamente, tanto el inicio como la progresión de la senescencia foliar pueden ser afectados por señales tanto endógenas como ambientales. A continuación, se sintetizan los factores más relevantes:

Edad: en ausencia de estrés, la senescencia de las hojas es inducida por señales endógenas relacionadas a cambios en el desarrollo que ocurren con la edad, denominados *ARCs* (Fig. 1) (*ARCs*; del inglés: *Age-Related Changes*), los cuales son irreversibles y estrictamente dependientes del momento ontogénico de la hoja (Schippers *et al.*, 2007). Todo cambio físico o bioquímico generado por un proceso del desarrollo puede ser considerado un *ARC*, aunque no todos son fácilmente detectables (Jibran *et al.*, 2013). De esta manera, los *ARCs* se acumularán determinando las distintas fases de la “ventana de la senescencia” resultando en eventos tangibles que describen el envejecimiento de la hoja (Fig.1). Si bien estos cambios asociados a la edad ocurren inevitablemente, los tiempos en los que ellos se desencadenan no son siempre los mismos y están principalmente controlados por la integración de señales endógenas (genéticas y hormonales), así como por señales ambientales (Jing *et al.*, 2005; Schippers *et al.*, 2007; Jibran *et al.*, 2013).

Los posibles mecanismos propuestos como iniciadores de la senescencia dependiente de la edad son: el cambio del balance nutricional de la hoja, especialmente en aquellas especies monocárpicas (Sklensky y Davies, 2011). La extirpación de las flores o frutos extiende la longevidad de las hojas en algunas especies de leguminosas (Pic *et al.*, 2002) y en girasol (Sadras *et al.*, 2000), aunque este efecto no ha sido observado en la senescencia foliar de *Arabidopsis* (Noodén y Penney, 2001). Por otro lado, la acumulación progresiva de especies reactivas de oxígeno, *ROS* (del inglés: *reactive oxygen species*, *ROS*) ha sido propuesta como una señal del inicio de la senescencia (Schippers *et al.*, 2008; Mayta *et al.*, 2018) junto con la disminución de la eficiencia fotosintética (Hensel *et al.*, 1993). Cambios estructurales en la actividad y degradación de proteínas asociadas a la fotosíntesis, como la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), también han sido descritas de estar reguladas por la edad (Kato *et al.*, 2004).

Estrés biótico y abiótico: La disponibilidad de luz, el estado hídrico y nutricional del suelo, temperaturas extremas, disponibilidad de CO<sub>2</sub>, infecciones por patógenos y estrés oxidativo inducido por ozono o luz ultravioleta pueden inducir y/o acelerar la tasa de senescencia (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Hörtensteiner *et al.*, 2009; Sadras *et al.*, 2000; Weaver y Amasino, 2001). La senescencia foliar presenta un alto grado de interacción entre las señales endógenas y los factores ambientales, involucrando distintos genes cuya expresión es inducida o inhibida, en distintas etapas del proceso (Guo y Gan, 2005). La participación de señales endógenas como las hormonales podría ser el factor integrador entre diferentes procesos ambientales y del desarrollo que desencadenan la senescencia (Jibran *et al.*, 2013).

Entre las hormonas reguladoras de la senescencia foliar se destacan las siguientes:

Etileno: El etileno es esencial para muchos procesos de las plantas, como la germinación, el desarrollo de las plántulas y la maduración de los frutos, pero también se ha demostrado que

desempeña un papel en la regulación del comienzo de la senescencia (Kim *et al.*, 2015). La exposición de las plantas al etileno induce el amarillamiento prematuro de las hojas en *Arabidopsis* (Jing *et al.*, 2005), mientras que mutantes insensibles al etileno, *etr1* y *ein2* (ETHYLENE RECEPTOR-1 y ETHYLENE-INSENSITIVE 2), retrasan el inicio de la senescencia en las hojas (Grbić y Bleecker, 1995; Lartey *et al.*, 1997). Además, ciertas mutantes de *Arabidopsis* con fenotipo de senescencia retrasada resultaron tener defectos en los genes involucrados en la biosíntesis y señalización del etileno. Sin embargo, en estos casos la senescencia es capaz de progresar una vez que el proceso ha comenzado (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003), por lo que el etileno no parecería ser esencial para la ocurrencia de la senescencia, pero sí para la determinación del momento de inicio de este proceso en la hoja, posiblemente modulando los tiempos en la aparición de ciertos ARCs (Jing *et al.*, 2002, 2005). Sin embargo, la capacidad del etileno para acelerar la senescencia en las hojas depende del momento de madurez de las mismas, ya que el agregado exógeno de etileno acelera de forma prematura la senescencia en hojas maduras y competentes, pero no en hojas jóvenes (Grbic y Bleecker, 1995; Jing *et al.*, 2002).

Ácido abscísico (ABA): el ácido abscísico regula numerosos procesos de crecimiento y desarrollo como la dormición de semillas, germinación, embriogénesis, cierre estomático, crecimiento radicular, maduración de frutos y la senescencia, entre otros (Brunetti *et al.*, 2019). En tejidos vegetativos, el ABA juega un rol importante en la respuesta al déficit hídrico, estimulando el cierre estomático y previniendo la deshidratación, además de inhibir la transición a la fase reproductiva (Harris y Outlaw, 1991). Los niveles de ABA en condiciones normales son mantenidos en bajas concentraciones, sin embargo, sus niveles aumentan considerablemente frente a un estrés hídrico, salino o térmico (Yang *et al.*, 2002). Se han observado aumentos en los niveles endógenos y señalización de ABA durante la senescencia de las hojas en varias especies (He *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010). Además, aplicaciones exógenas de ABA y tratamientos de salinidad inducen la expresión de varios genes asociados a la senescencia, capaces de acelerarla (Allu *et al.*, 2014; Breeze *et al.*, 2011; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2016). Esto sugiere que el ABA es importante para la integración de las señales ambientales asociadas al estrés abiótico que podrían desencadenar el inicio de la senescencia foliar. Al igual que el etileno, la acción del ABA en la regulación de la senescencia asociada a la edad sería dependiente del grado de maduración de las hojas (Lee *et al.*, 2011).

Ácido jasmónico: los jasmonatos son hormonas capaces de regular un amplio rango de procesos asociados al crecimiento y desarrollo, tales como la germinación, el crecimiento radicular, la fertilidad, la producción de antocianinas, la senescencia y la defensa frente a estreses bióticos y abióticos (Bruinsma *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2017; Thines *et al.*, 2019; Wasternack, 2007). En hojas senescentes los niveles de ácido jasmónico son cuatro veces mayores que en hojas jóvenes, lo cual se correlaciona con la activación diferencial de la expresión de genes que codifican enzimas

de su biosíntesis (He *et al.*, 2002). Aplicaciones exógenas de ácido jasmónico o metil-jasmonato, resultan en un aumento en genes marcadores de la senescencia (Jung *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2004) así como en una disminución de la expresión de distintos genes asociados a la fotosíntesis como el gen de la Rubisco activasa (RCA, *RuBisCO ACTIVASE*, Shan *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de la basta información que vincula al ácido jasmónico con la senescencia, el rol de estas hormonas en el inicio del proceso y en la regulación de la senescencia mediada por la edad no está bien comprendida (Seltmann *et al.*, 2010), aunque su acción como integrador de las señales asociadas al estrés y su abundancia en tejidos senescentes indicarían un rol preponderante por parte de esta hormona como promotora de la senescencia (Jibrán *et al.*, 2013).

Ácido salicílico (SA): el ácido salicílico es una hormona que regula varios procesos del crecimiento que incluyen la germinación, la floración, la maduración de frutos, la senescencia y defensa frente a distintos tipos de estrés (Vlot *et al.*, 2009; Zhang y Li, 2019). De manera similar al ácido jasmónico, los niveles endógenos de ácido salicílico son cuatro veces más altos en hojas senescentes respecto de hojas no senescentes (Carr *et al.*, 2003). Tratamientos con ácido salicílico inducen la senescencia prematura en *Arabidopsis*. Sin embargo, su acumulación no es esencial para la inducción de genes asociados al proceso de la senescencia natural en *Arabidopsis* (Quirino *et al.*, 2000). Análisis de micromatrices en plantas de *Arabidopsis* mostraron que el 19% de genes identificados como sobre-expresados durante la senescencia estuvieron sub-expresados en plantas mutantes deficientes en la vía de señalización mediada por SA evidenciando un posible rol de esta hormona como integrador de señales asociadas a la senescencia foliar (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Por otro lado, líneas de *Arabidopsis* mutantes para la enzima SA 3-hidroxilasa (*SALICYLIC ACID 3-HYDROXYLASE*, S3H) involucrada en el catabolismo de esta hormona acumularon altos niveles de SA y presentaron una senescencia prematura, mientras que otras líneas mutantes de ganancia de función mostrando niveles de SA extremadamente bajos presentaron un aumento en la longevidad de sus hojas (Zhang *et al.*, 2013).

Citoquininas: estas hormonas son ampliamente conocidas por actuar en la regulación de varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación, el desarrollo apical y radicular, la nodulación, los ritmos circadianos y la senescencia (Argueso *et al.*, 2010; Perilli y Sabatini, 2010) así como por su función en la aclimatación a distintos tipos de estrés (Kim *et al.*, 2006). Las citoquininas tienen un efecto supresor de la senescencia foliar. La aplicación exógena de citoquininas, o de sus análogos sintéticos, retrasan la senescencia, en plantas de soja, tabaco y *Arabidopsis* (Noodén y Penney, 2001; Rivero *et al.*, 2010). Análisis de transcriptos en hojas senescentes revelaron una disminución en los genes asociados a la síntesis de citoquininas, como el gen que codifica para la isopentil transferasa (*ISOPENTYL PHOSPHOTRANSFERASE*, *IPT*) y la citoquinina sintasa, así como un aumento en los niveles de las enzimas asociadas a la degradación de esta hormona, como la citoquinina oxidasa (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Además, las

citoquininas logran retrasar la senescencia cuando la transcripción de los genes necesarios para su biosíntesis, como la *IPT*, se encuentra regulada bajo el promotor del gen asociado a la senescencia, *SAG12* (Gan y Amasino, 1995; Guo y Gan, 2014). De la misma manera, mutaciones de ganancia de función en el receptor de citoquininas AHK3 (ARABIDOPSIS HISTIDINI-KINASE 3, AHK3) genera un retraso en la senescencia, mientras que mutantes de pérdida de función del mismo receptor confiere una sensibilidad reducida al retraso de la senescencia inducida por citoquininas (Kim *et al.*, 2006). Si bien se hipotetizó que la senescencia ocurre cuando los niveles de las citoquininas disminuyen su abundancia en hojas maduras, plantas con menores niveles de estas hormonas causado por la sobre-expresión constitutiva de un gen asociado a su catabolismo (Schmülling *et al.*, 2003), no presentaron senescencia prematura, lo que indicaría que las citoquininas no estarían regulando el inicio sino el desarrollo de la senescencia.

Giberelinas: las giberelinas son hormonas conocidas por su efecto en la elongación celular, salida de la dormición y germinación de semillas, crecimiento reproductivo, senescencia y tolerancia a varios estreses ambientales (Bartoli *et al.*, 2013; Vandenbussche *et al.*, 2016). Una primera aproximación de la relación entre las giberelinas y la senescencia foliar fue reportada por Fletcher y Osborne (1965), quienes mostraron que las giberelinas causan un retraso en la senescencia de *Taraxacum officinale* a través del mantenimiento de los niveles de clorofila y la síntesis de ARN. Además, su forma activa disminuye con la edad de las hojas (Schippers *et al.*, 2007) mientras que la disponibilidad de giberelinas libres (AG4 y AG7) inhibe la senescencia foliar (Yu *et al.*, 2009). Por otro lado, recientemente otros autores como Chen *et al.*, (2014) demostraron que las giberelinas también promueven la degradación de proteínas DELLA como RGL1 (RGA-LIKE 1), las cuales interfieren con la transcripción de genes asociados la senescencia, demostrando un rol promotor de la senescencia mediada por la edad en hojas de Arabidopsis (Chen *et al.*, 2014, 2017; Zhang *et al.*, 2018). Además, mutantes triples en los receptores de Giberelinas *gid1a* (*Gibberellin insensitive dwarf 1a*), *gid1b* y *gid1c* presentaron un retraso en la senescencia de sus hojas (Chen *et al.*, 2017). Estos resultados demuestran un posible rol dual de esta hormona en la regulación de la senescencia, sugiriendo que su participación en la regulación de este proceso podría estar determinada por su interacción con otras vías hormonales.

Auxinas: este grupo de hormonas actúan principalmente controlando el crecimiento y desarrollo celular, incluyendo la embriogénesis, la dominancia apical, diferenciación vascular y desarrollo de raíces (Kim *et al.*, 2011). La determinación del rol de las auxinas en el proceso de senescencia ha sido compleja debido a su importancia en los distintos aspectos del desarrollo vegetal (Lim *et al.*, 2007). Estudios tempranos mostraron que el agregado de auxinas retrasa la senescencia foliar (Noodén *et al.*, 1979; Sacher, 1957) mientras que la expresión del marcador de senescencia *SAG12* se ve reducida en hojas senescentes tratadas con esta hormona (Noh y Amasino, 1999). Estudios transcriptómicos en hojas senescentes de algodón presentaron una disminución en la



expresión de genes asociados a las vías de señalización de las auxinas (Lin *et al.*, 2015). Además, líneas mutantes en genes represores de la vía de las auxinas como *ARF1* (*AUXIN RESPONSE FACTOR 1*) y *ARF2*, mostraron un retraso en la senescencia (Lim *et al.*, 2010), mientras que la sobre-expresión de genes asociados a la biosíntesis de estas hormonas retrasaron la senescencia en hojas de *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2011) indicando que las auxinas tendrían un rol negativo en la regulación del proceso.

### **Eventos moleculares asociados al proceso de senescencia foliar**

El resultado final de las actividades celulares que subyacen al proceso de senescencia es la conversión de los materiales acumulados por los procesos anabólicos en nutrientes fácilmente exportables hacia regiones en activo crecimiento como meristemas, hojas jóvenes, primordios florales, semillas y frutos en desarrollo (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2003). La senescencia puede ser vista como un proceso de muerte y degradación celular, aunque en el fondo es un mecanismo altamente regulado a nivel genético, que se desarrolla de forma ordenada y secuencial que asegura una eficiente removilización de nutrientes y la supervivencia de las plantas en las próximas generaciones (Ali *et al.*, 2018). En un análisis de movilización de nutrientes en hojas de *Arabidopsis*, se encontró una disminución de la concentración de nutrientes como Mo, Cr, S, Fe, Cu, y Zn en hojas senescentes en un 50% comparado con hojas verdes, mientras que los niveles de N, P y K se vieron disminuidos en un 80% (Himelblau y Amasino, 2001). Los niveles citosólicos de glutamina sintetasa se incrementan durante la senescencia. Dicha enzima, se encuentra involucrada en la conversión de aminoácidos a glutamina, el mayor aminoácido móvil involucrado en el transporte de nitrógeno a larga distancia, incrementando la eficiencia en el reciclaje de este nutriente (Navabpour *et al.*, 2003). En hojas senescentes de arroz, la forma citosólica de la glutamina sintetasa se encuentra localizada predominantemente en los haces vasculares, indicando un rol activo en el transporte de nitrógeno. Los ácidos grasos liberados pueden ser convertidos a azúcares a través de la gluconeogénesis, o en ácidos orgánicos vía el ciclo del glioxalato (Chen *et al.*, 2000).

A nivel celular, la ejecución del proceso de senescencia ocurre de manera coordinada. Los cloroplastos son las primeras organelas destinadas a la degradación, junto con su contenido proteico y la clorofila (Hörtensteiner y Kräutler, 2011). Múltiples enzimas han sido descritas asociadas al catabolismo de la clorofila como la clorofilasa (Benedetti y Arruda, 2002), la feoforbida a oxigenasa y la reductasa del catabolito rojo de la clorofila (Pruzinska *et al.*, 2005).

El contenido proteico de los cloroplastos representa el 70% de las proteínas totales de las células de la hoja, destacándose en gran medida la Rubisco y la proteína de unión a clorofila a/b (CAB) (Lim *et al.*, 2007). Las células de las hojas pierden cerca de dos tercios de las proteínas solubles

durante la senescencia (Díaz-Mendoza *et al.*, 2016; Inada *et al.*, 1999). La degradación de las proteínas en los cloroplastos comienza de manera temprana resultando en la disminución de la capacidad fotosintética (Hörtensteiner y Feller, 2002). El proceso es llevado a cabo inicialmente por proteasas presentes dentro de la misma organela (Feller *et al.*, 2008; Lorenza Costa *et al.*, 2013), mientras que luego la degradación de estas proteínas continúa por la acción de proteasas vacuolares (Hörtensteiner y Feller 2002; Martínez *et al.*, 2008). Las serin-proteasas y cisteín-proteasas son las más abundantes asociadas al proceso, aunque las aspárticas, treonin-proteasas y metalo-proteasas también fueron descritas (Roberts *et al.*, 2012; Díaz-Mendoza *et al.*, 2014). Las cisteín-proteasas aumentan marcadamente su expresión y su actividad durante la senescencia foliar, siendo además las enzimas que presentan la mayor actividad en ensayos *in vitro* (Martínez *et al.*, 2007; Navabpour *et al.*, 2003; Poret *et al.*, 2017), demostrando un rol importante por parte de este tipo de proteasas en la degradación de proteínas durante la senescencia foliar. Por otro lado, existen evidencias de la importancia de la degradación de proteínas no cloroplásticas por la vía de la ubiquitinación durante la senescencia y en respuesta a señales ambientales. Un ejemplo es el incremento de la expresión de *pSEN3*, un gen que codifica para una poli-ubiquitina en hojas senescentes de *Arabidopsis* (Park *et al.*, 1998).

En cuanto a los lípidos, se ha reportado que durante la senescencia se debilita la estructura e integridad funcional de las membranas celulares como consecuencia de un aumento en el catabolismo de los lípidos de membrana (DeWitt *et al.*, 1998). Fosfolipasa D, ácido fosfatídico fosfatasa, lipoxigenasa, entre otras, son enzimas encargadas de la hidrólisis y metabolismo de los lípidos de membrana y muestran un aumento en los niveles de transcriptos analizados por ensayos de micromatrices (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005), lo cual indica la importancia de estas vías en la degradación y removilización de los lípidos durante la senescencia. (Thompson *et al.*, 1998; 2000). Plantas transgénicas de *Arabidopsis* con expresión alterada de lipasas de membrana, muestran un fenotipo con retraso de la senescencia (Eulgem *et al.*, 2000). Los productos de la degradación de los lípidos son metabolizados y convertidos a azúcares móviles transportados por el floema (Kaup *et al.*, 2002).

La degradación de las macromoléculas genera a su vez un aumento en los niveles de ROS, posiblemente sumado a una disminución de la protección oxidativa (Rogers y Munné-Bosch, 2016). Dicha protección comprende la compartimentalización en organelas, así como la acción de enzimas superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas. Durante el proceso de senescencia se pierde la compartimentalización, por rotura de las membranas lipídicas, y disminuye la síntesis de enzimas protectoras (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Guo y Gan, 2005).

Simultáneamente, otras organelas, como por ejemplo los peroxisomas, también son sometidos a degradación, mientras que los núcleos, necesarios para transcripción génica y regulación del

proceso, así como las mitocondrias, fuente esencial de energía, se mantienen intactos hasta los últimos momentos (Guiamet *et al.*, 2002; Noodén y Penney, 2001). Esto refleja la necesidad de las células foliares de mantenerse funcionales hasta etapas tardías de la senescencia, contribuyendo a la efectiva removilización de los materiales celulares.

La etapa final del proceso es la muerte de las células de la hoja, la cual ocurre una vez que los nutrientes generados del catabolismo han sido relocalizados (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). Esta serie de pasos, que ocurren ordenadamente, hacen que la senescencia esté incluida dentro de un proceso de muerte celular programada (MCP), por el cual las células promueven su propia muerte a través de la activación de un sistema de autodestrucción (Gan y Amasino, 1997). La MCP se manifiesta por síntomas tales como el colapso vacuolar, la condensación de la cromatina, y la fragmentación del ADN (Thomas *et al.*, 2003). El proceso catabólico de desmantelamiento involucra la formación de autofagosomas que contienen macromoléculas y organelas. La membrana externa del auto-fagosoma se fusiona con la membrana vacuolar; su contenido es liberado dentro de la vacuola y degradado por hidrolasas (Soto-Burgos *et al.*, 2018). Posteriormente, ocurre la desintegración de las membranas plasmática y vacuolar. La pérdida de integridad de la membrana plasmática conduce a la disrupción de la homeostasis celular, culminando la vida de la célula. Si bien la senescencia resulta en niveles masivos de muerte celular, ésta sólo ocurre cuando el proceso ha sido completado, antes de que ocurra el colapso vacuolar con lo cual la tasa de degradación celular se considera baja hasta la últimos estadios del proceso, evidenciando un fuerte nivel de organización (Tan *et al.*, 2003; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003).

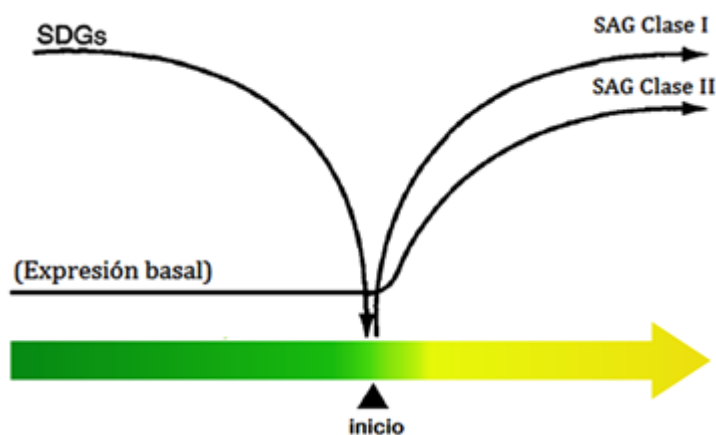
### **Expresión génica durante la senescencia foliar**

El inicio, progresión, y finalización de la senescencia foliar está bajo control directo del núcleo celular, e involucra una extensiva reprogramación de la expresión génica (Woo *et al.*, 2013). La regulación del proceso ha sido estudiada particularmente en especies modelo como *Arabidopsis thaliana* (Balazadeh *et al.*, 2008; Breeze *et al.*, 2011; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Navabpour *et al.*, 2003) y parcialmente en otras como arroz (Lee *et al.*, 2001), tabaco (Pageau *et al.*, 2006), tomate (Ghanem *et al.*, 2008), girasol (Fernandez *et al.*, 2012; Moschen *et al.*, 2014, 2016, 2019), entre otras (*Leaf senescence database*, Liu *et al.*, 2011).

En hojas senescentes, los genes asociados a la senescencia, llamados SAG (del inglés: *Senescence Associated Genes*) se hallan mayoritariamente sobre-expresados (Guo y Gan, 2005), logrando así los cambios que llevan a la progresión de la senescencia. Entre ellos se encuentran genes que codifican para proteínas asociadas a la transducción de señales, al almacenamiento y transporte de nutrientes, así como enzimas degradativas (proteasas, lipasas, ARNasas, ADNasas,

entre otras) (Gepstein *et al.*, 2003; Hensel *et al.*, 1993; Lohman *et al.*, 1994; Matallana-Ramirez *et al.*, 2013; Ryu y Wang, 1995; Taylor *et al.*, 1993). A su vez, los genes SAG pueden ser agrupados en varias categorías de acuerdo a su función: degradación de macromoléculas y reciclado, transporte de aminoácidos, metabolismo, detoxificación, genes regulatorios, entre otros (Gepstein *et al.*, 2003; Fernandez *et al.*, 2012).

Los genes SAG se clasifican en dos clases, dependiendo de los patrones temporales de expresión (Fig. 2). Los genes SAG de clase I, o específicos de la senescencia, son aquellos cuyos transcritos sólo son detectados durante la senescencia, mientras que, los pertenecientes a la clase II, se observan en etapas tempranas del desarrollo, con un nivel de expresión basal, aunque su abundancia incrementa considerablemente una vez que el proceso se establece (Fig. 2). Por otro lado, los genes *SDG* (del inglés: *Senescence Down-regulated Genes*) permanecen sub-expresados, sus niveles de transcritos disminuyen cuando se inicia la senescencia y reflejan, por ejemplo, genes involucrados en la fotosíntesis como los que codifican para las proteínas de unión a la clorofila (CAB; del inglés: *Chlorophyll a-b binding protein*) y subunidades de la Rubisco (Gan y Amasino, 1997; Balazadeh *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Expresión diferencial de genes durante la senescencia foliar. Los *SDG* disminuyen sus niveles transcripcionales cuando se inicia la senescencia. Por otro lado, los *SAG* aumentan su expresión al inicio del proceso. Los de clase I son expresados solo durante el inicio de la senescencia, mientras que los de clase II tienen un nivel de expresión basal temprano durante el desarrollo foliar, y su expresión aumenta una vez establecida la senescencia. Figura adaptada de Gan y Amasino (1997).

Además de su asociación con el avance de la senescencia, la expresión de los *SAG* puede ser inducida en las hojas por exposición de las plantas a diferentes tipos de estrés, como por ejemplo oscuridad (Lambert *et al.*, 2017), sequía (Chen *et al.*, 2015; Janack *et al.*, 2016), infecciones por patógenos (Liu *et al.*, 2018), ozono (Miller *et al.*, 1999), radiación UV-B (John *et al.*, 2001), estrés oxidativo (Navabpour *et al.*, 2003), salinidad (Ghanem *et al.*, 2008; Seo y Park, 2011) y altas temperaturas (Jespersen *et al.*, 2015, 2016) entre otros. Diferentes señales pueden inducir

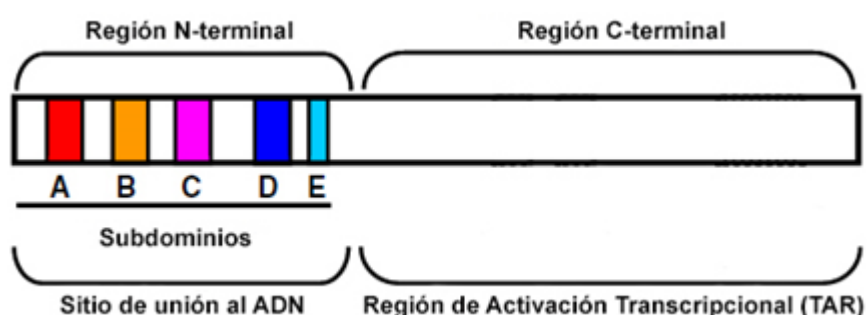
diferentes grupos de genes (Cao *et al.*, 2018; Park *et al.*, 1998; Weaver *et al.*, 1998), los cuales pueden iniciar distintos procesos bioquímicos y fisiológicos, reflejando que algunos de ellos forman parte de diferentes vías de señales. La inactivación o sobre-expresión de muchos genes SAG puede no tener un efecto significativo en el proceso de senescencia, lo cual es razonable teniendo en cuenta la gran cantidad de genes que participan en la regulación del proceso y a la redundancia génica que normalmente se observa en distintas especies de plantas. Además, existen evidencias de genes de tipo SAG que retrasan la senescencia, como el factor de transcripción *JUNGBRUNNEN1* (*JUB1*), el cual es inducido por peróxido de hidrogeno y regula negativamente la senescencia foliar mediante la inhibición del estrés oxidativo (Wu *et al.*, 2012). Por otro lado, el factor de transcripción *VND-INTERACTING2* (*VNI2*) es otro regulador negativo que integra señales del ABA en la senescencia a través de los genes *COLD-REGULATED* (*COR*) y *RESPONSIVE TO DEHYDRATION* (*RD*) (Yang *et al.*, 2011).

### **Factores de transcripción asociados a la senescencia**

Los factores de transcripción (FTs) son proteínas clave que participan en la regulación de la transcripción del ADN a través de su unión a elementos en *cis* localizados en las regiones regulatorias 5' de los genes blanco, resultando en su activación y/o supresión (Balazadeh *et al.*, 2008). Los genes que codifican FTs representan una fracción importante de los genes que aumentan su expresión a lo largo de la senescencia, lo que da idea de que este grupo de proteínas reguladoras es particularmente importante en la coordinación del inicio y la progresión del proceso (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). En *Arabidopsis*, se han encontrado alrededor de 240 FTs sobre-expresados durante la senescencia, los cuales pertenecen a más de 20 familias, destacándose miembros de las familias: NAC, WRKY, AP2/EREBP, C2H2, C3H, bZIP, bHLH y MYB (Balazadeh *et al.*, 2008; Breeze *et al.*, 2011; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Hasta el momento, varios de ellos han sido funcionalmente caracterizados y relacionados con la senescencia, principalmente miembros de las familias NAC, WRKY y MYB en *Arabidopsis*.

La familia NAC es específica de plantas, siendo una de las más numerosas con más de 100 miembros en *Arabidopsis* (Olsen *et al.*, 2005; Ooka *et al.*, 2003) y otras especies como arroz (*Oryza sativa*) (Hu *et al.*, 2006), soja (*Glycine max*) (Le *et al.*, 2011), trigo (*Triticum sativum*) (Kawaura *et al.*, 2008), álamo (*Populus trichocarpa*) (Hu *et al.*, 2010), cítricos (*Citrus sp.*) (Liu *et al.*, 2009), entre otras. Sus miembros han sido implicados funcionalmente en una gran variedad de procesos, entre los cuales se destaca la regulación de la división celular, la senescencia, la formación de elementos xilemáticos, el control de la removilización de nutrientes y las respuestas a diferentes tipos de estreses tanto bióticos como abióticos, entre otros (Balazadeh *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016; Seo *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2009).

El acrónimo NAC surge originalmente de tres genes que contienen la secuencia consenso que define al dominio NAC altamente conservado: *NAM* (del inglés: *no apical meristem*), *ATAF* (del inglés: *Arabidopsis transcription activation factor*), y *CUC* (del inglés: *cup-shaped cotyledon*) (Jin *et al.*, 2017; Wang y Dane, 2013). Su estructura está conformada por un dominio N-terminal de unión al ADN, altamente conservado en las distintas especies, que a su vez se subdivide en 5 subdominios (A-E, 120-130 aminoácidos) y un dominio C-terminal divergente que contiene la región de activación transcripcional (TAR, del inglés: *transcriptional activation region*) (Fig. 3). Esta región permite interacciones específicas con el ADN y otras proteínas, otorgando así la diversidad de actividades transcripcionales que muestran estas proteínas (Lindemose *et al.*, 2014; Podzimska-Sroka *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Estructura del dominio NAC y del TAR en las proteínas NAC. La porción N-terminal de unión al ADN está conformada por cinco subdominios (A-E) que definen el dominio NAC. La porción C-terminal divergente contiene la región de activación transcripcional (TAR). Figura adaptada de Shen *et al.* (2009).

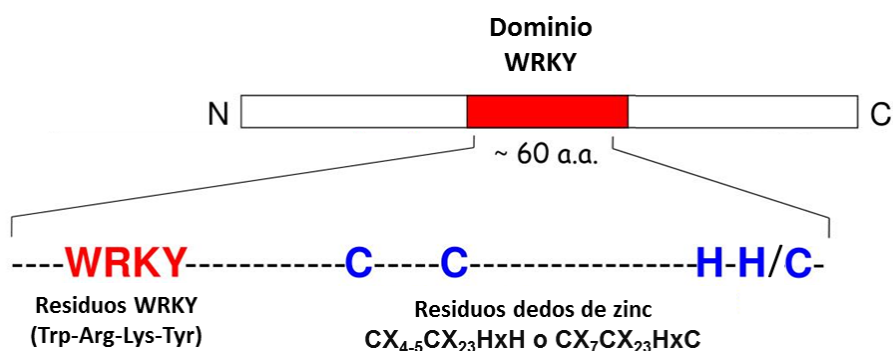
En varios cultivos de importancia agronómica, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas, se han identificado proteínas NAC con roles en la senescencia foliar (Luoni *et al.*, 2019). Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen la progresión de la misma aún no son bien comprendidos en estas especies (Chen *et al.*, 2014; Christiansen *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2015; Pimenta *et al.*, 2016; Sakuraba *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015). En *Arabidopsis*, una gran proporción de miembros de la familia NAC (aprox. 38%) cambian su expresión durante el avance de la senescencia, y varios de ellos han sido reportados como promotores o represores del proceso. Dentro de los genes más estudiados, *AtNAP/ANAC029* (Guo y Gan, 2006), *ORE1/ANAC092* (Kim *et al.*, 2009), *ORS1/ANAC059* (Balazadeh *et al.*, 2011), *ANAC016* (Kim *et al.*, 2013) y *ATAF1/ANAC002* (Garapati *et al.*, 2015) regulan positivamente la senescencia foliar, mientras que *JUB1/ANAC042* (Wu *et al.*, 2012) y *VNI2/ANAC083* (Yang *et al.*, 2011) la regulan negativamente.

*AtNAP/ANAC029* (NAC-LIKE, ACTIVATED BY AP3/PI) ha sido ampliamente reportado como un regulador central de la senescencia mediada por ABA en *Arabidopsis* (Guo y Gan 2006; Zhang y Gan, 2012). *AtNAP* se localiza en el núcleo y aumenta fuertemente su expresión en hojas senescentes. Mutantes de inserción por T-DNA muestran un retraso importante de la senescencia

foliar, el cual es recuperado mediante la transformación con el gen completo *AtNAP* o el de sus ortólogos de arroz y poroto, *OsNAP* y *PvNAP* en líneas mutantes de pérdida de función *atnap* (Guo y Gan, 2006). Además, las plantas sobre-expresantes de *AtNAP* muestran senescencia acelerada en *Arabidopsis*, y promueven la degradación de la clorofila mediante la inducción de genes asociados a la biosíntesis del ABA, como *AAO3* (*ABSCISIC ALDEHYDE OXIDASE 3*) que en última instancia generan un aumento en los niveles de otros genes *SAG* como *SGR1* (*STAY-GREEN 1*), *NYC1* (*NON-YELLOW COLORING 1*) y *PaO* (*PHEIDE a OXYGENASE*) (Yang *et al.*, 2014). A partir de la caracterización inicial por parte de Guo y Gan (2006), muchos trabajos se han reportado demostrando la importancia de *AtNAP* y de sus respectivos ortólogos en monocotiledóneas (arroz, trigo, cebada, mijo) y dicotiledóneas (soja, tomate, algodón) como genes reguladores centrales de la senescencia (Luoni *et al.*, 2019). En todas estas especies, los ortólogos de *AtNAP* aumentan sus niveles a lo largo del desarrollo foliar, y en muchos casos, su sobre-expresión genera senescencia temprana mediante la inducción de genes implicados en el proceso a través de la vía del ABA, mientras que su silenciamiento retrasa la senescencia foliar, con ventajas en características agronómicas como se demostró para el arroz y el algodón (Christiansen *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2015; Guo y Gan, 2006; Hénanff *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2018; Moschen *et al.*, 2014; Pinheiro *et al.*, 2009; Uauy *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2018).

*AtORE1* aumenta su expresión durante la senescencia y la promueve a través de la modulación de la expresión de múltiples genes, incluyendo nucleasas, transportadores de azúcares y diversos genes *SAG* (Kim *et al.*, 2009, 2014). Su rol en la senescencia fue descubierto a través del análisis de mutantes por pérdida de función que presentan fenotipo de senescencia foliar retrasada (Kim *et al.*, 2009, 2014). *AtORE1* participa en una vía regulatoria que involucra a *AtEIN2* (del inglés: *ETHYLENE-INSENSITIVE 2*) y al microARN *miR164* (Kim *et al.*, 2009). En hojas jóvenes la acumulación de transcritos de *AtORE1* está controlada por *miR164*, que interactúa con el ARNm desencadenando su degradación. Mientras que en hojas adultas *AtEIN2*, un regulador positivo central de la señalización del etileno es activado por una vía dependiente de la edad de la hoja. *AtEIN2* codifica para una proteína que se localiza en la membrana del retículo endoplásmico (Alonso *et al.*, 1999; Bisson *et al.*, 2009) donde al activarse se somete a la escisión y la translocación al núcleo regulando negativamente la expresión de *miR164* y, en consecuencia, permite la acumulación del ARNm de *AtORE1*. Dos de los genes blanco más estudiados de *AtORE1* asociados a la senescencia son *AtBFN1* (*BIFUNCTIONAL NUCLEASE-1*) y *AtNOL* (*NYC1-LIKE*), los cuales son promovidos transcripcionalmente por unión directa de *AtORE1* a los promotores de estos genes. El gen *AtBFN1* codifica para una nucleasa tipo I, que participa en la degradación de los ácidos nucleicos favoreciendo el reciclado de nucleótidos y fosfatos durante la senescencia (Matallana-Ramirez *et al.*, 2013). El gen *AtNOL* codifica para una enzima que reduce la clorofila b, a clorofila a, que luego es degradada durante la senescencia (Qiu *et al.*, 2015).

La familia de FTs WRKY, es denominada de esta manera por la secuencia aminoacídica casi invariable de su dominio de unión al ADN que contiene residuos wrky (triptófano, arginina, lisina, tirosina) en su región N-terminal, junto con una estructura de dedos de zinc hacia la región lindante con el extremo C-terminal, presentando una extensión de 60 aminoácidos aproximadamente (Fig. 4) (Eulgem *et al.*, 2000). El dominio WRKY se encuentra altamente conservado en plantas siendo una de las familias de FTs más abundante (Ülker y Somssich, 2004). Esta familia se divide en tres grandes grupos dependiendo del número de repeticiones del dominio WRKY. El grupo I contiene dos mientras que los grupos II y III presentan un único dominio. A su vez, el grupo II se divide entre los subgrupos IIa-e dependiendo de su secuencia aminoacídica y los residuos de dedos de zinc (Zhang y Wang, 2005). La familia WRKY comprende proteínas involucradas en respuestas al estrés biótico y abiótico, en procesos del desarrollo, así como en la regulación de la expresión de genes durante la senescencia (Pan y Jiang, 2014; Phukan *et al.*, 2016).



**Figura 4.** Estructura del dominio WRKY. El dominio de unión al ADN WRKY posee una extensión de aproximadamente 60 aminoácidos, con los residuos wrky situados en la región central más próxima al N-terminal, mientras que los residuos de dedos de zinc se sitúan hacia la región lindante con el extremo C-terminal.

En *Arabidopsis*, la familia WRKY se compone por 74 genes aproximadamente con miembros reportados de regular la senescencia foliar (Rushton *et al.*, 2010). AtWRKY006, AtWRKY022, AtWRKY045, AtWRKY053 y AtWRKY075 actúan como reguladores positivos de la senescencia (Chen *et al.*, 2017b; Guo *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2011), mientras que AtWRKY018, AtWRKY054, AtWRKY057 y AtWRKY070 funcionan como reguladores negativos (Besseau *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2014; Potschin *et al.*, 2014; Ülker *et al.*, 2007). Líneas sobre expresantes de *AtWRKY022* muestran senescencia acelerada, mientras que mutantes de pérdida de función *atwrky022* presentan hojas con senescencia retrasada (Zhou *et al.*, 2011). *AtWRKY022* puede modular la expresión de otros miembros de la familia implicados en la regulación del proceso como *AtWRKY053* y *AtWRKY070* (Zhou *et al.*, 2011). Por otro lado, los reguladores negativos *AtWRKY054* y *AtWRKY070* parecen tener un rol cooperativo y redundante en la



regulación del proceso (Besseau *et al.*, 2012). Además, ambos miembros parecen interactuar directamente con *AtWRKY030*, el cual aumenta su expresión durante la senescencia asociada a la edad, sugiriendo un rol indirecto por parte de esta proteína en la regulación del proceso (Besseau *et al.*, 2012). Uno de los miembros más estudiados de esta familia en la regulación de la senescencia foliar en *Arabidopsis* es *AtWRKY053*, el cual aumenta su expresión en etapas tempranas del proceso, mientras que líneas mutantes *atwrky053* muestran un retraso en la senescencia de sus hojas (Miao *et al.*, 2004). Por otro lado, *AtWRKY018* reprime la expresión de *AtWRKY053*, actuando como un regulador negativo del proceso (Potschin *et al.*, 2014). *AtWRKY022* fue descrito como un regulador de la senescencia inducida por oscuridad, interaccionando con *AtWRKY006*, *AtWRKY053* y *AtWRKY070* (Zhou *et al.*, 2011). Por lo tanto, un alto grado de redundancia es esperable por parte de esta familia de FTs en la regulación de este proceso en *Arabidopsis*. Miembros de esta familia también fueron reportados como reguladores de la senescencia foliar en arroz, principalmente *OsWRKY42* (Han *et al.*, 2014), *OsWRKY80* (Ricachenevsky *et al.*, 2010) y *OsWRKY23* (Jing *et al.*, 2009). En algodón dos miembros fueron recientemente reportados como reguladores de la senescencia foliar, *GhWRKY27* (Gu *et al.*, 2019) y *GhWRKY42* (Gu *et al.*, 2018).

### **El proceso de senescencia floral**

La senescencia que ocurre en los pétalos parecería tener un rol evolutivo diferente respecto de la senescencia foliar, a pesar de que ambos órganos comparten el mismo origen. Este proceso no parece haberse seleccionado para la eficiente removilización de nutrientes, aunque en petunia la senescencia de los pétalos es importante para la removilización de fósforo, y algunos autores sostienen que la removilización de nitrógeno y fosforo a los ovarios y semillas en desarrollo sería particularmente importante en casos de deficiencia nutricional extrema (Jones, 2013; Thomas, 2003). La senescencia de los pétalos, al igual que la senescencia foliar, es un evento del desarrollo íntimamente regulado que se caracteriza por la degradación de macromoléculas, la ruptura del sistemas de membranas y en menor medida el reciclado de nutrientes, seguido de muerte celular programada (Rogers, 2013; Wang *et al.*, 2018).

Luego de la polinización, la senescencia ocurre rápidamente, evitando así la atracción de insectos que podrían comer las estructuras reproductivas. Este tipo de senescencia se caracteriza por un aumento en los niveles de etileno en el estigma y estilo a las 6 h de producida la polinización. Luego, un segundo aumento en los niveles de etileno ocurre a las 12-24 h conduciendo a la producción de etileno en la corola y la subsiguiente senescencia de los pétalos de manera acelerada, evidenciado por su marchitamiento a las 72-120 h (Clark *et al.*, 1997; Langston *et al.*, 2005). Por el contrario, en ausencia de polinización, comúnmente denominada senescencia

natural, los niveles de etileno aumentan paulatinamente con un máximo en los pétalos aproximadamente a los 8 días posteriores a la antesis, lo cual se correlaciona con aumento notable en su longevidad en comparación con la senescencia que ocurre luego de la polinización (Langston *et al.*, 2005).

Las flores de petunia pertenecen al grupo etileno-sensibles, en las cuales se observa un pico de etileno endógeno en las corolas previo a la senescencia natural, seguido de un incremento en los niveles de ABA previo al marchitamiento (Chang *et al.*, 2003; Van Doorn y Woltering, 2008; Langston *et al.*, 2005). En este tipo de flores, generalmente el agregado exógeno de etileno acelera la senescencia de sus flores, mientras que la inhibición de su biosíntesis o señalización suele retrasarla (Van Doorn y Woltering, 2008; Jones *et al.*, 2005; Trivellini *et al.*, 2016). Por el contrario, el agregado de ABA exógeno no acelera la senescencia en flores de petunia, sugiriendo que el aumento de esta hormona es una consecuencia del incremento previo en los niveles de etileno en las corolas (Trivellini *et al.*, 2016). Además, el incremento de ABA es dependiente de la sensibilidad al etileno, es decir, flores insensibles a dicha hormona no aumentan sus niveles de ABA (Jones *et al.*, 2009).

Los pétalos son un buen modelo para estudiar la regulación de la senescencia en general, ya que resultan poco influenciados por señales externas mientras que responden a señales endógenas asociadas a la edad y a las señales generadas por la polinización (Rogers, 2012; Wang *et al.*, 2018). En *Arabidopsis* y petunia, miembros de las familias NAC y WRKY aumentan su expresión en pétalos senescentes (Broderick *et al.*, 2014; Wagstaff *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018). Varios genes de estas familias que han sido identificados de participar en la senescencia foliar en *Arabidopsis*, aumentan además su expresión durante la senescencia de los pétalos en esta especie (Winter *et al.*, 2007, Wagstaff *et al.*, 2009), por lo que resulta interesante estudiar si estos componentes son capaces de regular además la senescencia en estos órganos. En la planta ornamental *Erysimum linifolium*, análisis globales de expresión revelaron patrones comunes y diferenciales entre las hojas y los pétalos de miembros de estas dos familias (Price *et al.*, 2008). En base a estas evidencias, no resulta sorprendente que al menos parte de los mecanismos de transducción de señales sean similares entre la senescencia foliar y los tipos de senescencia que ocurren en los pétalos. Siguiendo esta línea de razonamiento, recientemente se identificó a EPHEMERAL1 (EPH1), un miembro de la familia NAC que promueve la senescencia en los pétalos de una variedad etileno-insensible de la especie *Ipomoea nil*. Plantas que suprimen la expresión de este gen retrasan la senescencia llegando a duplicar su longevidad (Shibuya *et al.*, 2014). EPH1 es un putativo ortólogo funcional de ORE1 que participa en la señalización del etileno en los pétalos, tal a como lo hace ORE1 en las hojas. Llamativamente, EPH1 no es fuertemente expresado durante la senescencia foliar y plantas que suprimen EPH1 no presentan retraso de la senescencia en las hojas (Shibuya *et al.*, 2014). Las evidencias indican que genes de estas familias serían además capaces de regular

la senescencia en los pétalos y que entre especies podrían existir variaciones en su funcionalidad dependiendo del órgano en cuestión, lo cual abre un campo de estudio muy alentador.

En base a lo expuesto, el presente trabajo tiene como objetivo general el estudio del proceso de senescencia y su regulación mediante factores de transcripción de las familias NAC y WRKY en las hojas y pétalos de *P. hybrida* a través de la utilización de diferentes enfoques: fisiológicos, filogenéticos y transcripcionales; culminando con la caracterización funcional de genes candidatos. Los resultados obtenidos en esta tesis servirán para el mejoramiento de este cultivo ornamental y para la posterior generación de nuevas variedades con senescencia retrasada. Escasos e indirectos trabajos han sido reportados sobre la senescencia foliar en petunia, por lo que el estudio en esta especie es promisorio y permitirá responder a preguntas como por ejemplo el impacto que tendría la modulación de la tasa de senescencia foliar en la producción (por ej. en la generación de flores). Por otro lado, más allá de la importancia que podrían tener los genes caracterizados en esta tesis como reguladores de la productividad y la calidad de las flores, el retraso de la senescencia foliar es, en sí misma, una característica deseada por los mejoradores hortícolas. Actualmente, en el Instituto de Floricultura del INTA, lugar de trabajo del Dr. Trupkin, director asistente de la presente tesis, los géneros ornamentales *Petunia* y *Calibrachoa* están sujetos a planes de mejoramiento clásico para la obtención de variedades comerciales. Este instituto posee antecedentes en la transferencia de cultivares mejorados a partir de germoplasma nativo y mantiene convenios con empresas internacionales (Sakata seeds, Japón y ProvenWinners, USA) que los comercializan, poniendo de manifiesto el interés de la institución por generar nuevos conocimientos y variedades mejoradas para el sector agroindustrial.

## **HIPÓTESIS**

La expresión de ciertos FTs asociados a la senescencia foliar y/o de los pétalos en *P. hybrida* se inducen en estadios tempranos iniciando una cascada de expresión de genes relacionados con procesos degradativos que provocan una reducción del área foliar fotosintéticamente activa en hojas y un menor tiempo de vida de las estructuras reproductivas. Es posible estimar la asociación de estos genes con los procesos de senescencia midiendo sus niveles de expresión a través de PCR cuantitativa en hojas y pétalos de diferente edad, e identificar genes candidatos que regulen estos procesos. Plantas de *P. hybrida* transgénicas con niveles de expresión alterados para dichos FTs, presentarán cambios en la tasa de senescencia de sus hojas y/o pétalos, confirmando su participación en la regulación de estos procesos.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

El presente trabajo tiene como objetivo general estudiar el desencadenamiento y progresión de la senescencia foliar y de los pétalos en *P. hybrida* mediante la identificación de factores de transcripción involucrados en estos procesos a través de un análisis transcripcional y posteriormente funcional de genes candidatos.

### Objetivos específicos

1- Analizar parámetros fisiológicos relacionados con el avance de la senescencia foliar y de los pétalos en *P. hybrida* como la evolución del área foliar, contenido de clorofila, contenido de proteínas solubles, y parámetros moleculares como la expresión de genes marcadores de la senescencia como *PhSAG12* y *PhCAB2*.

2- Cuantificar la expresión de genes asociados a la senescencia que codifican para FTs de las familias NAC y WRKY en *P. hybrida*, putativos ortólogos a los descritos en la especie modelo *A. thaliana*, a partir de ARN mensajero extraído de hojas de diferente edad, así como ARNm extraído de pétalos en diferentes momentos de la senescencia natural e inducida por polinización.

3- Desarrollar análisis filogenéticos comparativos con especies emparentadas y con miembros de ambas familias con función reportada en la regulación de la senescencia en otras especies. Se pretenden integrar los cambios transcripcionales en distintos tipos de senescencia con los análisis filogenéticos para identificar potenciales genes candidatos capaces de regular la senescencia en petunia.

4- Estudiar la función en la senescencia foliar y de los pétalos de los candidatos seleccionados a través de la generación de plantas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento génico por ARN interferencia en *P. hybrida*. En dicha caracterización funcional se espera determinar el grado de asociación de los candidatos en la regulación de la senescencia foliar y floral, lo cual permitirá producir futuras modificaciones por edición génica en vistas al mejoramiento molecular del cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material vegetal y condiciones de cultivo para la caracterización de la senescencia foliar y de los pétalos en *P. hybrida*

Para evaluar los parámetros fisiológicos y moleculares relacionados con el avance de la senescencia en petunia, se utilizaron plantas de *Petunia x hybrida* 'F1 Ultra™ White' (Syngenta Flowers, Inc., USA). Las semillas fueron sembradas en macetas de 10-cm de diámetro conteniendo sustrato *GrowMix* (Terrafertil, Argentina) en cámaras de crecimiento SANYO a 20°C con un fotoperiodo de día largo y lámparas fluorescentes (16h luz / 8h oscuridad; 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; TLD 36W/830, Philips, France). Las macetas fueron regadas por subirrigación con solución nutritiva (Hakaphos® Rojo, COMPO, N:P:K 18:18:18) y rotadas regularmente para evitar efectos de posición en la cámara.

Para la evaluación de la Senescencia Natural de las Hojas (SNH), todas las mediciones se realizaron en muestras tomadas de la hoja 11. La elección de esta hoja radica en: 1) Representa una posición intermedia-superior en el tallo en donde la senescencia se produce concurrentemente con el final de la fase vegetativa y el comienzo del desarrollo floral; 2) Las hojas en esta posición del tallo se mostraron sincronizadas en cuanto a los tiempos de inicio y progresión de la senescencia entre las distintas plantas; y 3) el tamaño de la hoja es adecuado en cuanto a la biomasa necesaria para realizar los distintos experimentos. Las hojas fueron marcadas al llegar al 70% de su máxima expansión representando el primer punto de muestreo (3 días antes de la máxima expansión foliar). Bajo nuestras condiciones de cultivo, el área foliar máxima fue alcanzada aproximadamente 8 días luego de que el primordio foliar era visible a ojo desnudo (aprox. 0,5 cm de largo). Los subsiguientes puntos se tomaron hasta que se observaron síntomas visuales de amarillamiento (40% del área foliar a los 33 días de la máxima expansión), este último fue considerado como un punto de senescencia avanzado. Cada punto de muestreo se cosechó luego de 4 h de iniciado el período lumínico para evitar posibles efectos del reloj circadiano, resultando en un total de 6 puntos de muestreo desde el día -3 hasta el día 33 en relación a la máxima expansión foliar. Para cada punto se tomaron hojas de 10 plantas independientes, que fueron divididas en 3 réplicas biológicas con 3-4 hojas cada una. Las mismas fueron rápidamente sumergidas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su uso para cuantificar las variables fisiológicas y moleculares.

Para el estudio de la evolución de la Senescencia Natural de los Pétalos (SNP), las plantas fueron cultivadas en cámara con las condiciones controladas mencionadas anteriormente. El cultivar de petunia utilizado posee los estambres más cortos que el estigma, por lo que en ausencia de polinizadores externos no se produce la polinización y los pétalos senescen de forma natural. De esta manera se tomaron 5 puntos de muestreo comprendiendo los días 0, 3, 6, 9 y 11 desde el

momento de la antesis (día 0) hasta los primeros signos visibles de marchitamiento y pérdida de turgencia de las corolas (día 11). Para la evaluación de la Senescencia de los pétalos Inducida por Polinización (SIP), las flores al momento de la antesis fueron manualmente polinizadas esparciendo polen maduro sobre los estigmas. Se realizaron 5 puntos de muestreo comprendidos desde el momento inmediatamente previo a la polinización 0 h y luego a las 6, 24, 48 y 72 h en relación a la polinización. Para ambos procesos de senescencia floral, se tomaron los pétalos que conforman las corolas de 12 flores de plantas independientes. Las mismas fueron divididas en 3 réplicas biológicas con 4 corolas cada una, sumergidas rápidamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su uso para cuantificar las variables fisiológicas y moleculares asociadas al avance de la senescencia.

## **2. Análisis de parámetros fisiológicos y moleculares relacionados con el avance de la senescencia foliar y de los pétalos en *P. hybrida***

El avance de la senescencia foliar (SNH) y senescencia que ocurre en los pétalos (SNP) y (SIP) se evaluó a través de la cuantificación de parámetros fisiológicos y moleculares. Las muestras de hojas y pétalos fueron molidas en un mortero utilizando nitrógeno líquido. Para la SNH, la clorofila total fue extraída a partir de 50 mg de tejido molido utilizando 1 ml de *N,N'*-dimetilformamida e incubado por 3 días a -20°C. Las muestras fueron luego centrifugadas por 5 minutos a 12.000g y la absorbancia del sobrenadante fue cuantificada a 647 y 664 nm (clorofila b y a, respectivamente) utilizando un espectrofotómetro de placa Multiskan EX (ThermoScientific). Los niveles de clorofila se calcularon según Moran *et al.* (1982) y fueron relativizados al peso del tejido molido utilizado.

Las proteínas solubles para los tres procesos de senescencia evaluados fueron extraídas a partir de 150 mg de tejido molido utilizando 500 µl del *buffer* de extracción (50 mM fosfato de sodio pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 10 mM beta-mercaptoetanol). Las proteínas solubles se cuantificaron por el método de Bradford (*Protein Assay Dye Reagent*, Bio-Rad) midiendo las absorbancias a 600 nm utilizando un espectrofotómetro de placa. Las mediciones fueron extrapoladas a una curva de calibración generada a partir de suero de albumina bovina. Para la SNH los niveles de la subunidad mayor de la Rubisco (*RbcL*) fueron evaluados a través de electroforesis en gel. Previo a la realización de la electroforesis los extractos de proteínas fueron normalizados por el peso de la hoja equivalente a 650 µg de tejido molido y preparados con *cracking buffer* (SDS 10%, glicerol 50%, beta-mercaptoetanol 25%, bromofenol blue 0,01%, Tris-HCl pH 6,8 1,5M), hervidos durante 5 minutos y centrifugados a 12000g por 5 minutos. Los polipéptidos fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida (12%) con SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Los polipéptidos fueron visualizados por tinción con *Coomassie blue* (*Coomassie G-250 Brilliant Blue*, Sigma). En relación a los parámetros moleculares, se cuantificó la

expresión de genes marcadores del proceso por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) como se describe a continuación. Dichos genes son los putativos ortólogos a los descritos en *Arabidopsis* (*SAG12* y *CAB2*) los cuales han sido ampliamente utilizados en la literatura como marcadores del avance de la senescencia. *PhSAG12* fue medido en todos los tipos de senescencia analizados mientras que *PhCAB2* solo fue medido en la SNH.

### **3. Extracción de ARN y síntesis de ADN copia**

A partir de 150 mg de tejido molido de hojas y pétalos se realizaron extracciones de ARN utilizando el reactivo Tripure (Roche, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante para cada una de las réplicas biológicas. El ADN genómico fue eliminado mediante tratamiento con ADNasa (*DNase I*, Invitrogen Argentina) durante 20 minutos a temperatura ambiente (Invitrogen, Argentina). Una vez realizada la degradación de ADN, se corroboró su ausencia por PCR y corrida electroforética en un gel de agarosa utilizando oligonucleótidos específicos para cada una de las muestras. La concentración de ARN fue determinada con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies*) el cual permite la medición de un pequeño volumen de la muestra, estimando la concentración a partir de la absorbancia a 260nm, asumiendo que  $A(260\text{nm}) = 1$  equivale a 40  $\mu\text{g/ml}$  de ARN. A su vez, detecta reactivos contaminantes presentes en la misma. La pureza e integridad del ARN total fue determinada por la relación 260/280 nm y por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Partiendo de 2  $\mu\text{g}$  de ARN de cada muestra se realizó la síntesis de ADN copia (ADNc) utilizando la enzima para transcripción reversa *Superscript III* (Invitrogen) y oligonucleótidos aleatorios hexaméricos (*random primers*) según las instrucciones del fabricante. Para controlar que la síntesis de ADNc haya sido exitosa, se realizó una PCR utilizando oligonucleótidos diseñados para el factor de elongación *PhEF1a* seguida de electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

### **4. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)**

Una vez sintetizado el ADNc para cada una de las muestras, se determinaron los niveles de expresión de los distintos genes por qPCR. Con la misma metodología se determinó el nivel de expresión de los marcadores moleculares de senescencia *PhSAG12* y *PhCAB2* (Lim *et al.*, 2007); y del factor de elongación *PhEF1a* (Brooks *et al.*, 2014; Czechowski *et al.*, 2004; Løvdal y Lillo, 2009; Reid *et al.*, 2006) seleccionado como gen de referencia (ver resultados), así como la expresión de todos los genes estudiados en esta tesis. Oligonucleótidos específicos para cada gen fueron diseñados utilizando el programa *Beacon designer 6.0* (*Premier Biosoft International*) (Anexo 4). Para las reacciones de qPCR se utilizó el kit *FastStart Universal SYBR Green -master* (Roche) en



un termociclador de 96 wells StepOnePlus (AppliedBiosystems). Cada reacción de qPCR fue llevada a cabo en 13 µl, conteniendo 4,75 µl de agua, 0,5 µl de cada cebador (200 nM), 1 µl de ADNc y 6,25 µl de *FastStart Universal SYBR Green Master* (Roche). Se evaluaron simultáneamente controles negativos, uno sin el agregado de transcriptasa reversa y otro sin el agregado de templado. El programa de ciclado fue el siguiente: 95°C durante 10 minutos, y 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 1 minuto a temperatura de hibridación (60°C). La especificidad de la reacción fue verificada mediante el análisis de la curva de disociación o curva de *melting* luego de los 40 ciclos. Se utilizaron tres réplicas biológicas para cada punto de cosecha y dos réplicas técnicas para cada una de ellas. Para analizar las eficiencias de cada una de las réplicas se utilizó el programa LinReg PCR (11.0) (Ruijter *et al.*, 2009). Este programa determina, para cada una de las muestras, una ventana de linealidad en base a la fluorescencia en función del ciclo y realiza un análisis de regresión lineal ajustando el conjunto de datos de PCR a una línea recta de puntos. Las eficiencias de amplificación son calculadas en base a la pendiente de la curva de amplificación en la fase exponencial de cada una de las muestras (Pfaffl *et al.*, 2004). Los valores de eficiencias están comprendidos entre 1 y 2. Una eficiencia ideal del 100% indica que por cada ciclo de amplificación se duplicó la cantidad de producto (E=2). Este programa también permite el cálculo del ciclo de cuantificación (Cq) (Bustin *et al.*, 2010), para cada una de las muestras analizadas. Los datos de eficiencia y ciclo umbral (Fei *et al.*, 2011) se ingresaron en el programa fgStatistics (Di Rienzo, 2009) el cual compara los perfiles de expresión de los genes en relación al gen de referencia por medio del algoritmo matemático detallado en la Ecuación 1 (método  $\Delta\Delta Cq$ ; Pfaffl, 2001). Esta ecuación cuantifica la relación entre la expresión del gen candidato en el muestreo medido (muestra incógnita) en comparación con el primer punto de muestreo (control) y normalizado por el gen de referencia (gen ref), teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción de PCR (E) para ambos genes (Pfaffl, 2001). Esta relación de expresión fue utilizada para evaluar la diferencia de expresión de cada gen en particular durante el desarrollo de la senescencia.

$$\text{relación} = \frac{(E_{\text{gen}})^{\Delta Cq_{\text{gen}}(\text{control-muestra})}}{(E_{\text{gen ref}})^{\Delta Cq_{\text{gen ref}}(\text{control-muestra})}}$$

Ecuación 1: Cuantificación relativa de la expresión de un gen.

A los valores de la relación se les aplicó logaritmo en base 2 (Log2) y posteriormente se sometieron a un análisis estadístico descripto más adelante.

Los gráficos de todos los parámetros fisiológicos y moleculares fueron realizados con el programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software).

## **5. Identificación de factores de transcripción NAC y WRKY asociados a la senescencia en *P. hybrida***

Para la identificación de genes de las familias NAC y WRKY en petunia, potencialmente involucrados en procesos de senescencia, inicialmente se buscaron las proteínas de ambas familias de FTs en la especie modelo *Arabidopsis*. Para ello, se utilizó la plataforma PlantTFDB 3.0 (*Plant Transcription Factor Database*, <http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn>; Jin *et al.*, 2017). De las secuencias obtenidas se eliminaron las isoformas y variantes de *splicing* y se verificó que todas contengan los dominios característicos de su respectiva familia utilizando la base de datos PFAM (*Collection of protein families*; <https://pfam.xfam.org>) y ARAPORT (*Arabidopsis information portal*, <https://bar.utoronto.ca/thalemine/begin.do>). A partir de datos de expresión en hojas de *Arabidopsis* (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Breeze *et al.*, 2011; Wagstaff *et al.*, 2009) y repositorios disponibles en el dominio público *Leaf Senescence DataBase* (Liu *et al.*, 2011) y *Arabidopsis eFP Browser* (Winter *et al.*, 2007) se identificaron genes de ambas familias que cambian su expresión durante la senescencia. Luego, utilizando las secuencias de un transcriptoma foliar de *P. hybrida* (Villarino *et al.*, 2014) se creó un repositorio de secuencias de petunia (*Petunia Transcriptome Repository ATGC v1.0*; Gonzalez *et al.*, 2017). A partir de las secuencias de proteínas asociadas a la senescencia previamente identificadas en *Arabidopsis*, se buscaron mediante tBLASTn sus putativos ortólogos en el repositorio de *P. hybrida* y en los genomas de los parentales de *P. hybrida* (*P. axillaris* y *P. inflata*) (Anexos 1 y 2) disponibles en SOL Genomics Network (Bombarely *et al.*, 2016). Para la construcción de los árboles filogenéticos, las secuencias de los putativos ortólogos de petunia en otras especies fueron identificadas mediante BLASTp (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## **6. Alineamientos y análisis filogenéticos de las proteínas NAC y WRKY**

Para el análisis filogenético de la familia NAC y WRKY en *Arabidopsis* se realizó un alineamiento de la región N-terminal conteniendo el dominio NAC (subdominios A-E) de las 109 proteínas que conforman dicha familia en *Arabidopsis*, así como del dominio N-terminal que contiene el dominio WRKY de las 82 proteínas que componen esta familia, respectivamente, utilizando el software BioEdit (Hall, 1999). Posteriormente, utilizando el software ProtTest v3.4 (Abascal *et al.*, 2005) se determinó el modelo de Jones, Taylor, y Thornton (JTT) como mejor modelo evolutivo de sustitución de aminoácidos para los dos alineamientos de cada familia de FTs. Estos parámetros fueron utilizados para la construcción de los árboles filogenéticos del tipo *máximum-likelihood* (ML) utilizando el software PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010).

Para la reconstrucción de los árboles filogenéticos comparativos de cada familia de FTs, se utilizaron todas las secuencias de las proteínas obtenidas en *P. hybrida*, así como sus respectivos ortólogos en especies emparentadas de la familia Solanaceae, las seleccionadas de *Arabidopsis* a partir de las cuales se obtuvieron las de petunia, y secuencias de proteínas con una función reportada en senescencia obtenidas de diferentes especies de plantas. Para el análisis de la familia NAC, se utilizó la región N-terminal de 161 secuencias, mientras que para el árbol de la familia WRKY se utilizaron un total de 122 secuencias. El modelo evolutivo seleccionado fue *Jones, Taylor y Thornton* (JTT), utilizando el software ProtTest v3.4 (Abascal *et al.*, 2005). Estos parámetros se utilizaron para la construcción de los árboles del tipo *neighbor-joining* (NJ) con el software MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) el cual es más recomendable para análisis filogenéticos con un elevado número de secuencias. Los árboles de ambas familias fueron visualizados usando software *Figtree* v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Los datos del análisis de filogenia comparativa entre especies de ambas familias de FTs fueron complementados con una búsqueda de motivos conservados en las regiones más divergentes del extremo C-terminal de las proteínas. Para ello, se utilizó el programa MEME disponible en la web (Bailey *et al.*, 2009; <http://meme-suite.org/>). Los parámetros de análisis se fijaron en base a un estudio previo (You *et al.*, 2015).

## **7. Generación de *Clusters* y *Heatmaps* para el análisis de los patrones de expresión de genes *PhNAC* y *PhWRKY* en petunia**

Los perfiles de expresión obtenidos para los genes *PhNAC* y *PhWRKY* en petunia fueron agrupados en *Clusters* utilizando la herramienta *cmeans* del paquete de R e1071' (Dimitriadou *et al.*, 2006) y R Core Team, <https://www.R-project.org/>). Por otro lado, los análisis de tipo *Heatmap* fueron generados con la herramienta '*heatmaply*' presente en el paquete R.

## **8. Construcción de plásmidos para transformación de *P. hybrida* cv Mitchell Diploid**

Para el análisis funcional de los genes candidatos se generaron líneas transgénicas de sobre-expresión y de silenciamiento génico por ARN interferencia (ARNi) transformando plantas de *P. hybrida* cv. 'Mitchell Diploid'. El cambio de cultivar de petunia es particularmente importante para las líneas de silenciamiento, ya que las construcciones generadas se realizaron a partir de las secuencias del transcriptoma foliar de *P. hybrida* en el cual se utilizó la variedad Mitchell (Villarino *et al.*, 2014). Para las construcciones de los plásmidos se utilizó la tecnología *Gateway* (Invitrogen). Los plásmidos de sobre-expresión fueron generados amplificando por PCR la secuencia codificante de cada gen candidato a partir de muestras de ADNc de hojas. Los oligonucleótidos utilizados

fueron flanqueados por sitios *attB* (Anexo 4) que permitieron incorporar las secuencias de los genes candidatos en el vector de clonado pDONR/Zeo a través de una reacción de recombinación mediada por la enzima *Gateway* BP Clonasa siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Para las construcciones de las líneas de silenciamiento génico, se diseñaron micro ARNs artificiales específicos de 21 pb (amiRNAs) sobre los genes candidatos, utilizando el software *Web MicroRNA Designer* (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>; Schwab *et al.*, 2006). Dichos amiRNAs fueron introducidos en un precursor o *backbone* de maíz, Zm-miR156, que posee una alta eficiencia de silenciamiento en plantas (Chuck *et al.*, 2007) cuidando de no alterar su estructura secundaria y el correcto plegado del precursor mediante el uso de herramientas bioinformáticas como *miRBase* (<http://www.mirbase.org>; Kozomara *et al.*, 2019) y *The mfold Web Server* (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form2.3>; Markham y Zuker, 2008). Este precursor de maíz posee dos sitios de procesamiento pudiendo incorporar dos amiRNAs en una misma construcción. Para el diseño de los amiRNAs se tuvo en cuenta que las porciones de las secuencias a utilizar no pertenezcan a los dominios conservados de cada familia y que no presentaran homología de secuencia con otros genes (*off-targets*) mediante el uso de herramientas disponibles en *Web MicroRNA Designer* mencionada anteriormente. Los Zm-miR156 editados conteniendo los amiRNAs diseñados para silenciar los genes candidatos fueron solicitados a la empresa GenScript (USA) y flanqueados por secuencias *attB* para su recombinación e integración en el plásmido pDONR/Zeo. Cada vector resultante fue clonado en *Escherichia coli* DH-5 $\alpha$  en medio LB selectivo con Zeocina (25mg/L) y confirmado por *colony* PCR. El ADN plasmídico de cada cepa se obtuvo utilizando un kit comercial (Promega) seguido de una secuenciación de tipo Sanger utilizando los oligonucleótidos genéricos M13. Las distintas construcciones contenidas en el vector pDONR/Zeo fueron luego transferidas al vector de expresión constitutiva en plantas pEarleyGate100 (Earley *et al.*, 2006) en una segunda reacción de recombinación mediada por la enzima LR Clonasa (Invitrogen). Las construcciones resultantes fueron clonadas en *E. coli* en medio selectivo con Kanamicina (50mg/L), confirmadas por *colony* PCR y secuenciación de tipo Sanger con oligonucleótidos específicos. Finalmente, las construcciones resultantes fueron introducidas por electroporación en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.

## **9. Transformación de *P. hybrida* y confirmación de sobre-expresión y silenciamiento génico de genes candidatos de la familia NAC**

Cultivos de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*, conteniendo las distintas construcciones, fueron utilizados para transformar discos de hojas de *P. hybrida* cv. 'Mitchell Diploid' siguiendo el procedimiento descrito por Horsch *et al.* (1985), que involucra la regeneración *in vitro* de plantas transgénicas de petunia. El vector utilizado contiene el gen de resistencia al herbicida glufosinato

de amonio como marcador de selección. Hojas de plantas de petunia cultivadas en esterilidad fueron cortadas sobre una placa de Petri estéril conteniendo 30 ml de medio nutritivo líquido (WPM), removiendo la parte superior de la hoja y dejando la parte basal con una porción del pecíolo. Posteriormente, a cada placa se le agregó 400 µl de cultivo de *A. tumefaciens* en fase exponencial y 25 µl de acetosiringona (concentración final 200 µM) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego los explantos fueron secados parcialmente en papel estéril y transferidos a placas de Petri conteniendo WPM sólido. Los explantos se colocaron con la cara abaxial de la hoja en contacto con el medio y se los dejó co-incubar durante 3 días en presencia de luz a 25°C. Transcurridos los tres días, los explantos fueron lavados en frascos de vidrio estéril conteniendo 50 ml de agua estéril, 20 µl de ampicilina-sulbactam (concentración final 100 mg/l) y 40 µl de cefotaxima sódica (concentración final 400 mg/l), agitando suavemente cada 20 minutos para eliminar el *A. tumefaciens*. Aquellos explantos que se hundieron fueron descartados y el resto fueron transferidos a placas con WPM sólido conteniendo 6-bencilaminopurina (BAP, 3 mg/l) y ácido naftalenacético (ANA, 0.1 mg/l), ampicilina-sulbactam (100 mg/l), cefotaxima sódica (400 mg/l) y glufosinato de amonio (2 mg/l) (Liberty, Bayer). Luego de una semana, los explantos con primordios de callos fueron transferidos a placas conteniendo el mismo medio, pero con glufosinato de amonio (3 mg/l). Los repiques de los callos se realizaron cada una semana a medio fresco hasta la diferenciación del primer par de hojas. Una vez regenerado el vástago, el mismo fue repicado a medio WPM sin hormonas, antibióticos ni herbicida para su enraizamiento. Cada línea independiente regenerada *in vitro* fue verificada por PCR a través del diseño de oligonucleótidos específicos. La abundancia de transcritos tanto de las líneas de sobre-expresión como de silenciamiento génico para cada gen candidato fueron determinadas por qPCR siguiendo los procedimientos descritos en la sección 4. Para confirmar el silenciamiento en las líneas ARNi, se utilizaron oligonucleótidos específicos para una región del gen que no fuera incluida en el fragmento utilizado para el diseño de los amiRNAs de dicho gen. En ambos casos, para comparar los niveles de expresión de las líneas transgénicas se utilizaron plantas de petunia sin transformar regeneradas *in vitro*.

#### **10. Análisis de la senescencia foliar y de pétalos en las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de *PhNAC024* y *PhNAC017***

Para evaluar la funcionalidad de los genes candidatos seleccionados, se analizó la SNH, SNP y SIP en las líneas transgénicas obtenidas. Esquejes enraizados (conteniendo un nudo) fueron obtenidos a partir de las plantas T0 regeneradas *in vitro*, trasplantados a macetas y crecidos en cámaras a 24°C con un fotoperíodo de día largo y lámparas fluorescentes (16h luz / 8h oscuridad; 200 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; TLD 36W/830, Philips, France). Las macetas fueron regadas por subirrigación

con solución nutritiva (Hakaphos® Rojo, COMPO, N:P:K 18:18:18) y rotadas regularmente para evitar efectos de posición en la cámara. Al menos dos líneas independientes de cada construcción, así como plantas control no transformadas, fueron comparadas entre sí. Para estudiar la SNH, se seleccionó la hoja número 7 del tallo principal (fase vegetativa), a la cual se le evaluó su longevidad desde la máxima expansión hasta los primeros síntomas visibles de amarillamiento. El procedimiento de muestreo fue similar al previamente descrito en la sección 1. La cantidad de puntos de muestreo tomados para cada genotipo varió según la longevidad de sus hojas (ver sección resultados).

Para evaluar la SNP y la SIP, se analizó la longevidad de los pétalos desde la antesis hasta observar los primeros síntomas visibles de marchitamiento (pérdida de turgencia), como se describió anteriormente para los mismos procesos en la sección 1. La cantidad de puntos de muestreo tomados para cada genotipo varió según la longevidad de sus flores.

Las mediciones de los parámetros fisiológicos y moleculares asociados al avance de la senescencia (clorofila total, proteínas solubles, *PhCAB2* y *PhSAG12*), así como los niveles de expresión de los putativos genes cuya expresión podría estar modificada por la sobre-expresión y/o silenciamiento del gen *NAC* en estudio fueron medidos en las hojas y pétalos de las líneas transgénicas como se describe en las secciones 2 y 4, respectivamente.

#### **11. Análisis de parámetros morfológicos y tiempo a floración en las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de *PhNAC024* y *PhNAC017***

Se evaluaron parámetros morfológicos no necesariamente vinculados a la progresión de la senescencia. La altura de las plantas se midió desde la base del tallo principal hasta el inicio de la fase reproductiva. Se contó el número de ramificaciones laterales considerando aquellas yemas axilares con brotes mayores a 1 cm. Como medida indirecta de la robustez/calidad de las plantas se midió el diámetro del tallo principal en la porción media con un calibre digital. El tiempo a floración se evaluó como el número de hojas producidas por el tallo principal de cada planta hasta el cambio a la fase reproductiva.

#### **12. Análisis de las tasas fotosintéticas en las hojas y parámetros asociados al rendimiento en las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de *PhNAC024***

Se midieron las tasas de fotosíntesis neta y transpiración en hojas jóvenes recientemente expandidas y en hojas de 35 días desde su máxima expansión utilizando un analizador de gases de CO<sub>2</sub> portátil (*PPSystems, Portable Photosynthesis System, CIRAS-2*). Las plantas fueron

crecidas a 24°C en condiciones de fotoperiodo largo y radiación fotosintéticamente activa saturante (16h luz / 8h oscuridad; aprox. 450  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}^2$ ; lámparas de sodio de alta presión, Osram E40/400w). Simultáneamente, se midieron los niveles de clorofila total en las mismas hojas utilizando un medidor SPAD y una curva de calibración desarrollada previamente (*Soil Plant Analysis Development*, SPAD-502, Minolta Co.).

Como medidas asociadas al rendimiento de las plantas, se evaluó la biomasa aérea y la tasa de producción de flores. La biomasa aérea se midió luego de una semana de observar las primeras flores en los distintos genotipos, es decir un momento en el cual las plantas se encontraban establecidas en su desarrollo. El vástago de cada planta fue cortado en su base y se dejó secar en estufa a 55° C durante tres días para luego evaluar el peso seco en una balanza electrónica. La tasa de producción de flores se determinó contabilizando las flores generadas por unidad de tiempo, sin extraer las flores senescentes y ni las ya contabilizadas.

### **13. Análisis preliminares de senescencia inducida por oscuridad y agregado exógeno de ABA en las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de *PhNAC024***

Para estudiar la senescencia inducida por oscuridad, se transfirieron plantas adultas de cada línea independiente cultivadas *in vitro* a condiciones de oscuridad completa por 10 días. Para evaluar cambios en la sensibilidad al agregado exógeno de ABA durante senescencia foliar, hojas totalmente expandidas de las plantas transgénicas cultivadas *in vitro* fueron cortadas y transferidas a placas de Petri con medio WPM conteniendo ABA (80  $\mu\text{M}$ ). Como tratamiento control se utilizaron placas sin el agregado de ABA. En ambos casos, el nivel de senescencia foliar fue estimado visualmente. El contenido de clorofila total, proteínas solubles y los marcadores moleculares de senescencia (*PhSAG12* y *PhCAB2*) aguardan ser cuantificados a partir de las muestras cosechadas, por lo que no fueron incluidos en la presente tesis.

### **14. Análisis estadístico**

Los perfiles de expresión de los genes *PhNAC* y *PhWRKY* en la SNH, SNP y SIP que se encuentran en el Anexo 5 fueron sometidos a ANOVA de un factor seguido de tests de comparaciones múltiples de Tukey (*post-test*) utilizando el programa *GraphPad Prism 5* (*GraphPad Software*). Por otro lado, los distintos parámetros evaluados en las distintas líneas transgénicas de *PhNAC024* y *PhNAC017* fueron sometidos a ANOVA de dos factores seguido de tests de comparaciones múltiples de Tukey (*post-test*) utilizando el programa InfoStat versión 2018 (Di Rienzo *et al.*, 2018).

## RESULTADOS

### CAPÍTULO 1

#### **Estudio de la progresión de la senescencia foliar y de los pétalos en *P. hybrida* a través de la cuantificación de parámetros fisiológicos y moleculares**

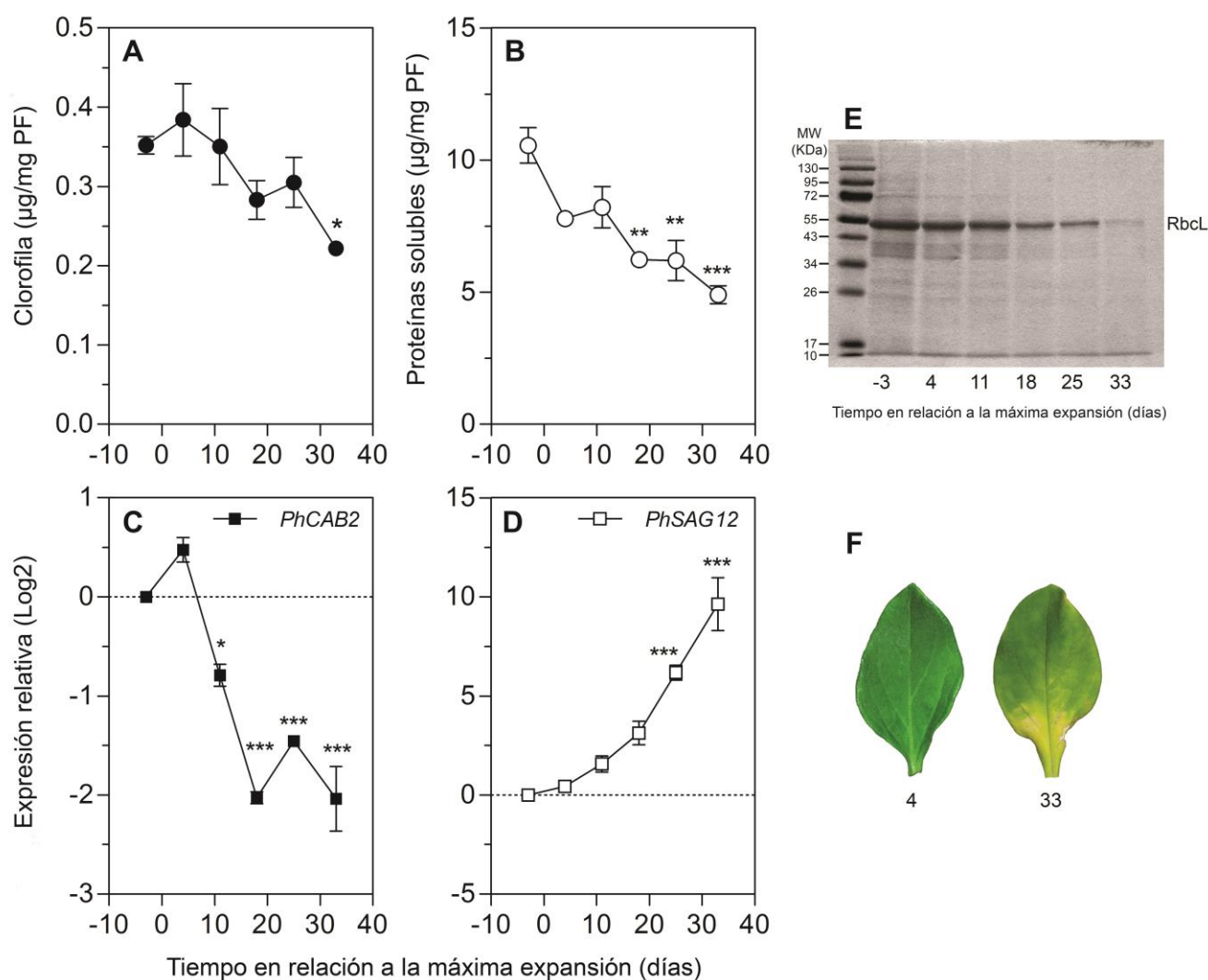
Con el objetivo de determinar los eventos subyacentes al inicio y la progresión de la senescencia en las hojas y en los pétalos de *P. hybrida* cv. 'Ultra White', se midieron distintos parámetros fisiológicos, como los niveles de clorofila y proteínas solubles, y moleculares, como la expresión de los genes marcadores de senescencia *PhCAB2* y *PhSAG12* en distintos momentos de la ontogenia de las hojas y los pétalos. Las plantas fueron cultivadas en cámara bajo condiciones de luz y temperatura controladas. El gen *CAB2* (*chlorophyll a/b binding-protein 2*) de *Arabidopsis* codifica para una proteína de unión a la clorofila involucrada en el funcionamiento del aparato fotosintético, y el gen *SAG12* (*senescence associated gene 12*) codifica para una cisteín proteasa asociada a la degradación de proteínas en estadios tardíos de la senescencia en hojas y pétalos (Breeze *et al.*, 2011; Grbic, 2002; Lohman *et al.*, 1994; Noh y Amasino, 1999; Wagstaff *et al.*, 2009).

La senescencia natural de las hojas (entendida como la senescencia que ocurre en ausencia de cualquier tipo de estrés, SNH) se evaluó desde momentos cercanos a la máxima expansión foliar (día -3), hasta que se observaron los primeros síntomas visibles de amarillamiento en las hojas (día 33) (Fig. 1). Los niveles de clorofila disminuyeron significativamente en etapas tardías (día 33; Fig. 1A y 1F), mientras que los niveles de proteínas solubles lo hicieron más temprano desde el día 18, disminuyendo a la mitad de sus niveles iniciales en las etapas tardías (Fig. 1B). En concordancia con las proteínas solubles, los niveles de la subunidad mayor de la Rubisco (*RbcL*) se mantuvieron estables en las etapas tempranas del proceso (días -3 y 4), comenzando a disminuir desde el día 18 (Fig. 1E).

Para cuantificar la expresión de los marcadores de senescencia en *P. hybrida*, fue necesario elegir un gen de referencia para relativizar los niveles de expresión. Se probaron dos conocidos genes de referencia utilizados en plantas, *EF1a* y *18S ARNr* (Czechowski *et al.*, 2005; Reid *et al.*, 2006; Løvdal *et al.*, 2009;). Ambos mostraron niveles estables de expresión en las distintas muestras de hojas, aunque *Ph18SARNr* mostró niveles muy elevados de expresión en todas las muestras, Ct menores a 10, mientras que *PhEF1a* mostró valores de Ct más normales, alrededor de 20, siendo similares a los valores de Ct de los genes *PhNAC* y *PhWRKY* cuantificados en petunia y en otras solanáceas (Liu *et al.*, 2018). Por lo tanto, el putativo ortólogo de *EF1a* en *P. hybrida* (*PhEF1a*), fue seleccionado para normalizar la expresión de los genes. La expresión de *PhSAG12* se mantuvo en valores bajos en las etapas iniciales del proceso, mostrando una tendencia a aumentar en estadios intermedios y un cambio significativo en el día 25, continuando con la misma tendencia hasta el día



33 donde alcanzó valores muy elevados en comparación con el día -3 (Fig. 1D). Por otro lado, la expresión de *PhCAB2* disminuyó significativamente desde el día 11, alcanzando valores mínimos y estables desde el día 18 (Fig. 1C). Los resultados indican que los estadios tempranos de la SNH estarían representados por los días -3 y 4, los estadios intermedios estarían representados por los días 11 y 18, mientras que los estadios tardíos estarían representados por los días 25 y 33.

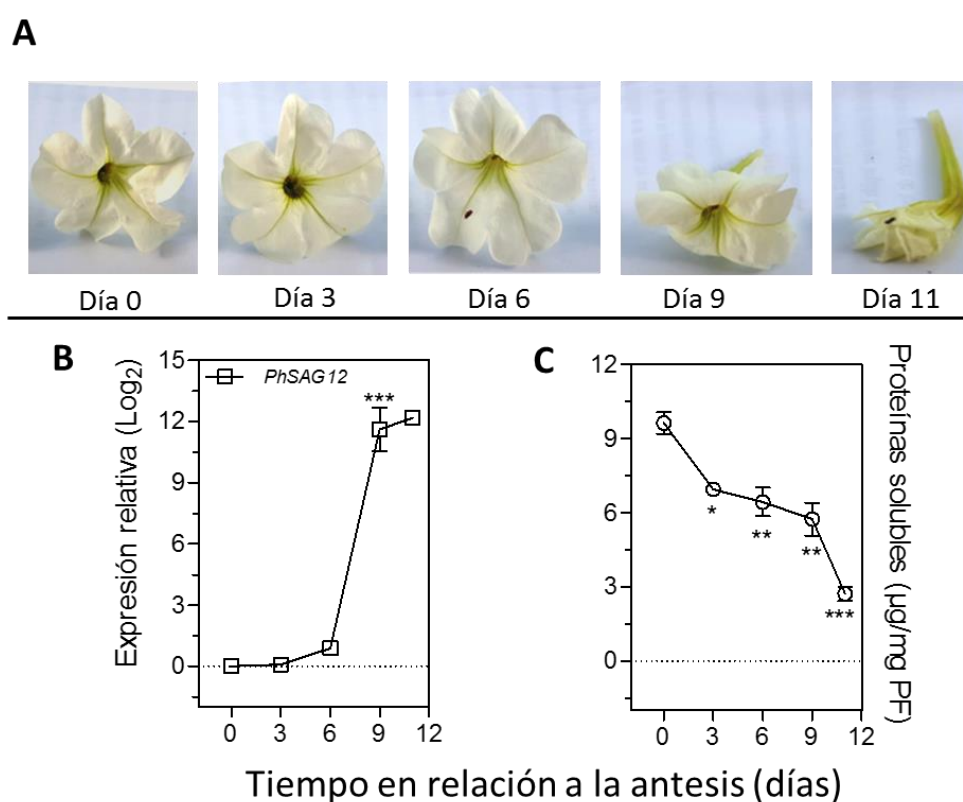


**Figura 1.** Análisis de parámetros fisiológicos y moleculares asociados a la progresión de la senescencia natural foliar (SNH) en *P. hybrida* cv. 'Ultra White'. (A) Contenido de clorofila y (B) proteínas solubles relativizadas al peso fresco de tejido utilizado (PF). (C) Niveles relativos de transcritos de *PhCAB2* y (D) *PhSAG12* representados como la relación (Log2) entre cada punto de muestreo y el primer punto de muestreo, normalizados a la expresión del gen de referencia *PhEF1a* (ver Materiales y Métodos). (E) Contenido de la subunidad mayor de la Rubisco (*RbcL*) analizado por SDS-PAGE y teñido con *Coomassie Blue*. Tres replicas biológicas fueron corridas en tres gels independientes. Se muestra la réplica más representativa. (F) Hojas de *P. hybrida* a los 4 (izquierda) y 33 (derecha) días en relación a la máxima expansión foliar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre medias de cada punto de muestreo en relación al primer punto de muestreo utilizando ANOVA de un factor seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras corresponden al error standard.

De manera similar, con el objetivo de caracterizar los eventos subyacentes al inicio y progresión de la senescencia en los pétalos de petunia, se cuantificaron los niveles de proteínas solubles y la

expresión de *PhSAG12* en la senescencia que ocurre de forma natural en los pétalos (en ausencia de polinización, SNP) así como la senescencia inducida por polinización (SIP).

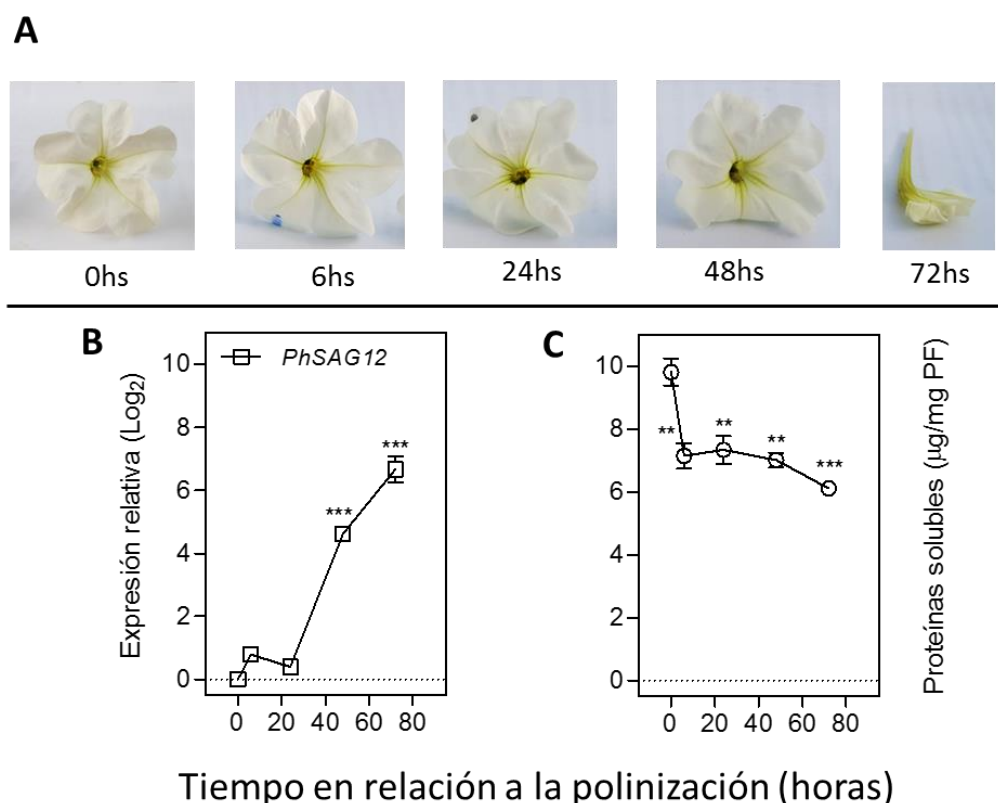
La SNP se evaluó desde el momento de antesis (día 0), hasta el marchitamiento de las corolas (día 11) (Fig. 2A). La expresión del gen marcador de senescencia *PhSAG12* aumentó fuertemente en los estadios tardíos (días 9 y 11; Fig. 2B), que coincide con el inicio de pérdida de turgencia de las corolas (Fig. 2A). Las proteínas solubles disminuyeron desde etapas tempranas, alcanzando valores mínimos en etapas avanzadas del proceso, llegando a casi un tercio de sus valores iniciales (Fig. 2C). Los resultados indican que los estadios tempranos de la SNP estarían representados por los días 0 y 3, el día 6 representaría un estadio intermedio, mientras que los días 9 y 11 representarían estadios tardíos.



**Figura 2.** Parámetros fisiológicos y moleculares asociados al avance de la senescencia natural en pétalos (SNP) de *P. hybrida* cv. 'Ultra White'. (A) Imágenes de los pétalos para cada punto de cosecha, desde la antesis (día 0) hasta el marchitamiento de las corolas (días 3, 6, 9 y 11 luego de la antesis). (B) Niveles relativos de transcritos de *PhSAG12* representados como la relación (Log<sub>2</sub>) entre cada punto de muestreo y el primer punto de muestreo, normalizados a la expresión del gen de referencia *PhEF1a* (ver Materiales y Métodos). (C) Proteínas solubles relativizadas al peso fresco de tejido utilizado (PF). Los asteriscos indican diferencias significativas entre medias de cada punto de muestreo en relación al primer punto de muestreo utilizando ANOVA de un factor seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras corresponden al error standard.

La senescencia inducida por polinización (SIP) se evaluó desde la antesis (instante previo a la polinización manual, día 0) hasta el marchitamiento de las corolas luego de la polinización artificial de las flores con polen maduro (6, 12, 24, 48 y 72 h) (Fig. 3A). La expresión del gen marcador de

senescencia *PhSAG12* se mantuvo con una expresión basal las primeras 24 h posteriores a la polinización, para luego expresarse fuertemente a las 48 h y alcanzar valores máximos a las 72 h (Fig. 3B), lo cual coincide con el momento de fuerte pérdida de turgencia de las corolas (Fig. 3A). Las proteínas solubles disminuyeron desde etapas muy tempranas de manera significativa (6 h; Fig. 3C), aunque los niveles en las etapas posteriores no fueron tan bajos como los observados en la SNP (Fig. 2C). Los resultados indican que los estadios tempranos de la senescencia inducida por polinización serían a las 0 y 6 h, el estadio intermedio a las 24 h, mientras que los estadios tardíos estarían representados por las 48 y 72 h luego de la polinización.



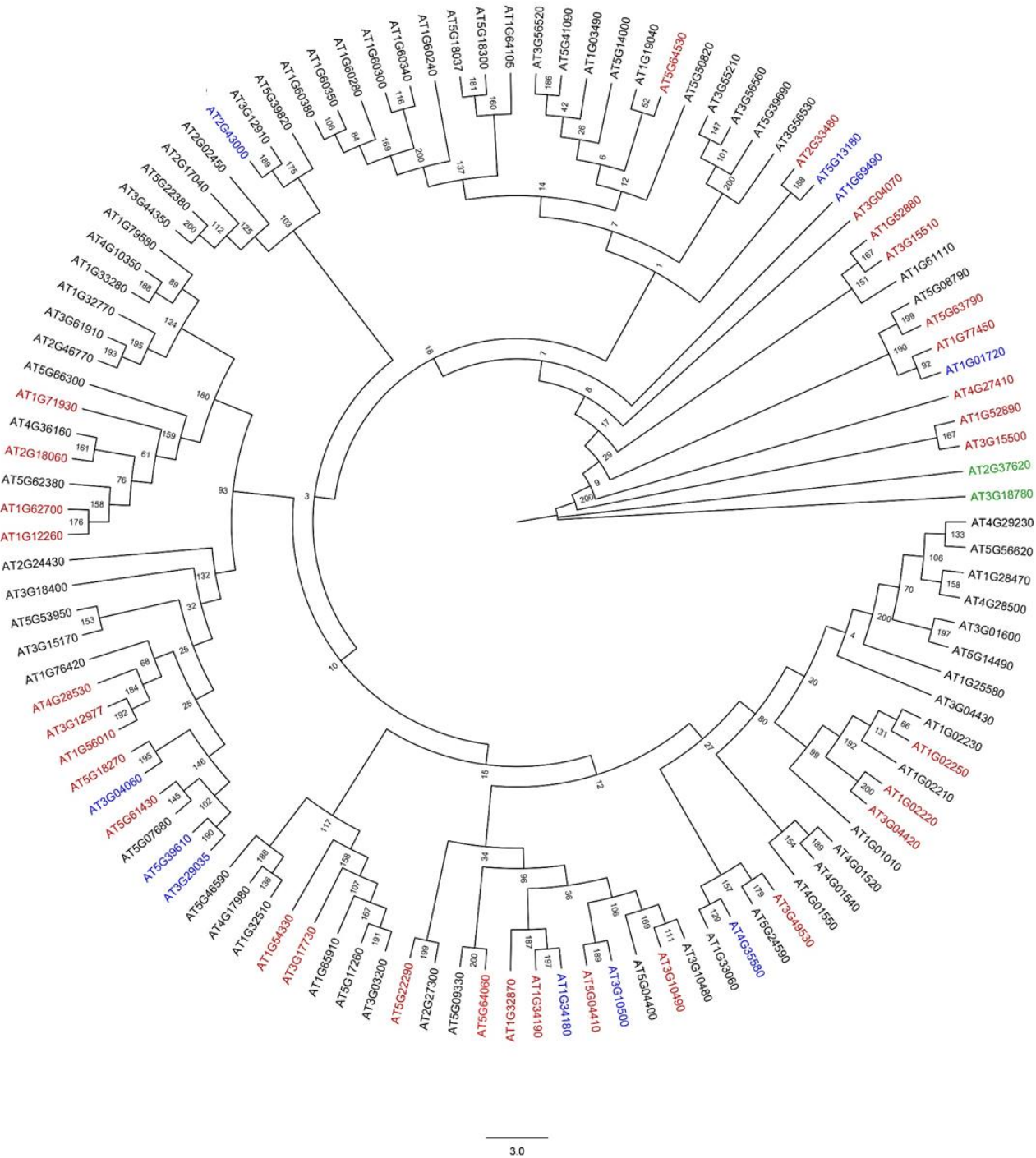
**Figura 3.** Parámetros fisiológicos y moleculares asociados al avance de la senescencia inducida por polinización (SIP) en pétalos de *P. hybrida* cv. 'Ultra White'. (A) Imágenes de los pétalos para cada punto de cosecha, desde la antesis (instante previo a la polinización, día 0) hasta el marchitamiento de las corolas luego de la polinización manual de las flores con polen maduro (6, 12, 24, 48 y 72 h). (B) Niveles relativos de transcritos de *PhSAG12* representados como la relación (Log<sub>2</sub>) entre cada punto de muestreo y el primer punto de muestreo, normalizados a la expresión del gen de referencia *PhEF1a* (ver Materiales y Métodos). (C) Proteínas solubles relativizadas al peso fresco de tejido utilizado (PF). Los asteriscos indican diferencias significativas entre medias de cada punto de muestreo en relación al primer punto de muestreo utilizando ANOVA de un factor seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras corresponden al error standard.

Los parámetros fisiológicos y moleculares seleccionados permitieron caracterizar satisfactoriamente la progresión, así como la ventana temporal de los tres procesos de senescencia analizados en *P. hybrida*.

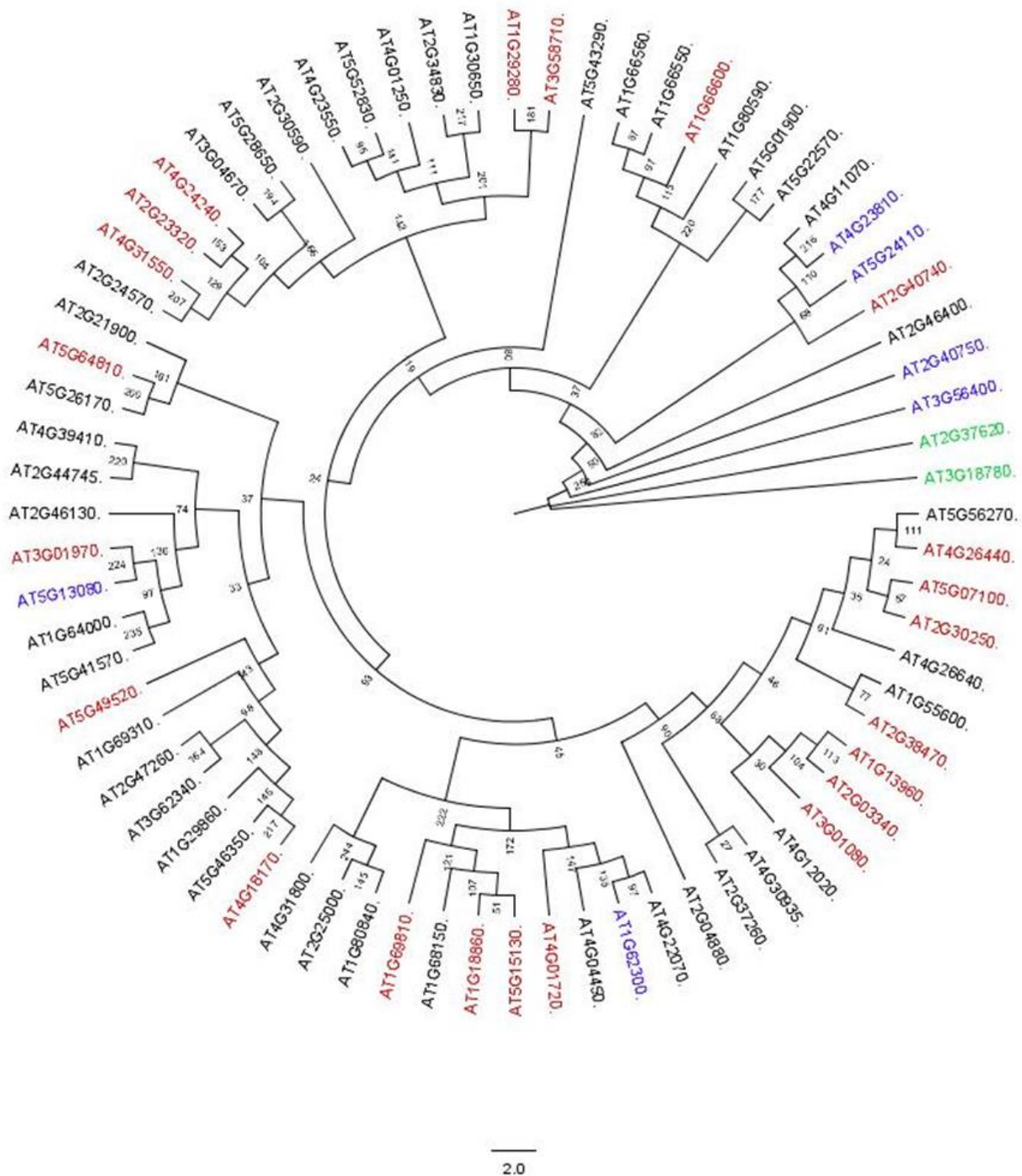
## CAPÍTULO 2

### **Búsqueda y selección de genes asociados a la senescencia de las familias NAC y WRKY en *P. hybrida***

Con el objetivo de identificar FTs que regulen procesos de senescencia en petunia, inicialmente se evaluó la totalidad de los miembros que componen las familias NAC y WRKY en la especie modelo *A. thaliana*. Miembros de ambas familias han sido reportados como reguladores de la senescencia foliar en *Arabidopsis* y en otras especies (Li *et al.*, 2014; Luoni *et al.*, 2019; Tripathi *et al.*, 2012). A partir de datos disponibles en el dominio público, se seleccionaron aquellos miembros de cada familia que presentaron expresión diferencial (sobre-expresados o sub-expresados) durante la progresión de la senescencia foliar en *Arabidopsis*. Un total de 41 miembros de la familia NAC (aproximadamente 39% del total de miembros de la familia) y 28 de la familia WRKY (aproximadamente 36%) fueron seleccionados (*Leaf Senescence Database; Arabidopsis eFP Browser; Buchanan-Wollaston et al.*, 2005; Wagstaff *et al.*, 2009; Breeze *et al.*, 2011; Christiansen *et al.*, 2011). Una vez identificados, nos propusimos analizar si estos miembros de las familias NAC y WRKY de *Arabidopsis* pertenecían a alguna subfamilia en particular. Para ello, las secuencias aminoacídicas de cada familia fueron sujetas a un análisis filogenético del tipo *maximum-likelihood*. Los candidatos seleccionados se distribuyeron uniformemente a lo largo de distintos grupos filogenéticos, sin presentar un enriquecimiento en ninguna subfamilia en particular (Figs. 4-5). Estos genes pertenecen a 6 de un total de 8 subfamilias descritas por Shen *et al.* (2009) para la familia NAC y a 6 de un total de 7 subfamilias para la familia WRKY según Eulgem *et al.* (2000).



**Figura 4.** Árbol filogenético de la familia NAC en Arabidopsis. Se utilizó la región N-terminal que contiene el dominio NAC (subdominios A-E). En rojo se muestran los miembros que cambiaron su expresión durante el avance de la senescencia foliar. En azul se muestran los miembros que fueron reportados de tener una función regulatoria en la senescencia foliar. En verde se muestran dos miembros de la familia de las actinas de Arabidopsis que conforman el grupo externo.



**Figura 5.** Árbol filogenético de la familia WRKY en Arabidopsis. Se utilizó la región N-terminal que contiene el dominio WRKY. En rojo se muestran los miembros que cambiaron su expresión durante el avance de la senescencia foliar. En azul se muestran los miembros que fueron reportados de tener una función regulatoria en la senescencia foliar. En verde se muestran dos miembros de la familia de las actinas de Arabidopsis que conforman el grupo externo.

De los 41 genes *NAC* seleccionados, 36 aumentan su expresión (88%) durante el avance de la senescencia foliar, mientras que sólo 5 disminuyen su expresión. Las proteínas codificadas por 10 de estos genes representan reguladores de la senescencia foliar reportados en la literatura (Tabla 1). De los 36 genes sobre-expresados, 28 cambian su expresión desde etapas tempranas (E),

mientras que 4 lo hacen en etapas intermedias (M) y solo uno en etapas tardías de la senescencia (L). (Tabla 1). De los 5 genes *NAC* sub-expresados, uno cambia su expresión en etapas tempranas (Tabla 1). Por otro lado, se analizó la expresión de los 41 genes *NAC* seleccionados en pétalos de flores al momento previo a la antesis (estadio 12) y en flores en antesis recientemente polinizadas (estadio 15) según datos de *Arabidopsis eFP browser* (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) y Wagstaff *et al.* (2009) (Tabla 1). De los 36 genes *NAC* sobre-expresados en hojas, 20 (56%) aumentan su expresión a lo largo de la ontogenia de los pétalos (Tabla 1), mientras que los 5 genes que disminuyen su expresión en la senescencia foliar también lo hicieron durante la senescencia de los pétalos (Tabla 1). Estos datos indican que la mayoría de los genes *NAC* seleccionados cambian su expresión en estadios relativamente tempranos de la senescencia y que además estos mismos genes podrían estar participando en la regulación de la senescencia de los pétalos inducida por polinización en *Arabidopsis*.

<i>Arabidopsis thaliana</i>								<i>Petunia hybrida</i>			
Código AGI	Sinónimo	Subfamilia	Expresión en hojas	Expresión en pétalos	Refs	Función en senescencia foliar	Refs	Mejor entrada	Sinónimo	Entrada de menor orden	Sinónimo
AT3G15500	ANAC055; NAC055; NAC3	NAC-a	umenta (E)	umenta	1,2,3,17	indefinido	5	comp33806_c0_seq1	PhNAC101	-	-
AT1G52890	ANAC019; NAC019	NAC-a	umenta (E)	umenta	1,2,3,17	indefinido	5	comp33806_c0_seq1	PhNAC101	-	-
AT4G27410	ANAC072; RD26	NAC-a	umenta (E)	umenta	1,2,3,17	indefinido	5	comp33806_c0_seq1	PhNAC101	-	-
AT1G01720 (*)	ANAC002; ATAF1	NAC-a	umenta (E)	-	1,2,3	promueve	6	comp30243_c0_seq1	PhNAC097	-	-
AT1G77450	ANAC032; NAC032	NAC-a	umenta (E)	-	1,2,3	indefinido	n/d	comp30243_c0_seq1	PhNAC097	-	-
AT5G63790	ANAC102; NAC102	NAC-a	umenta (E)	umenta	1,2,3,17	indefinido	n/d	comp16927_c0_seq1	PhNAC033	-	-
AT3G15510	ANAC056	NAC-a	umenta (E)	umenta	1,2,3,17	indefinido	n/d	comp16927_c0_seq1	PhNAC033	-	-
AT1G52880	ANAC018; NAM	NAC-a	umenta (E)	umenta	1,2,3,17	indefinido	n/d	comp16927_c0_seq1	PhNAC033	-	-
AT3G04070	ANAC047; NAC047	NAC-a	umenta (E)	umenta	1,2,3,17	indefinido	n/d	comp30243_c0_seq1	PhNAC097	-	-
AT1G69490 (*)	ANAC029; NAP; ATNAP	NAC-a	umenta (E)	umenta	1,2,3,17	promueve	7	comp559557_c0_seq1 (P)	PhNAC024	-	-
AT5G13180 (*)	ANAC083; NAC083; VNI2	NAC-f	umenta (E)	umenta	1,2,3,17	retrasa	8	comp11118_c0_seq1	PhNAC106	comp17685_c0_seq1 (P)	PhNAC108
AT2G33480	ANAC041; NAC041	NAC-f	umenta (E)	umenta	1,2,3,17	indefinido	n/d	comp11118_c0_seq1	PhNAC106	comp17685_c0_seq1 (P)	PhNAC108
AT5G64530	ANAC104; XND1	NAC-a	umenta	umenta	1,3,17	indefinido	n/d	comp24829_c0_seq2	PhNAC089	comp209662_c0_seq1 (P)	PhNAC005
AT2G43000 (*)	ANAC042; NAC042; JUB1	NAC-e	umenta (E)	-	1,2,3	retrasa	9	comp27121_c0_seq1	PhNAC004	-	-
AT1G71930	ANAC030; VND7	NAC-c	disminuye (E)	disminuye	2,3,17	indefinido	n/d	comp102798_c0_seq1	PhNAC086	-	-
AT2G18060	ANAC037; VND1	NAC-c	disminuye	disminuye	3,4,17	indefinido	n/d	comp102798_c0_seq1	PhNAC086	-	-
AT1G62700	ANAC026; VND5	NAC-c	disminuye	disminuye	3,4,17	indefinido	n/d	comp22278_c0_seq3 (P)	PhNAC082	-	-
AT1G12260	ANAC007; NAC07; VND4	NAC-c	disminuye	disminuye	3,4,17	indefinido	n/d	comp17026_c0_seq1 (P)	PhNAC052	comp199967_c0_seq1 (P)	PhNAC053
AT4G28530	ANAC074; NAC074	NAC-d	umenta (M)	umenta	2,17	indefinido	n/d	comp20998_c0_seq2 (P)	PhNAC051	comp20998_c0_seq1 (P)	PhNAC085
AT3G12977	n/d	NAC-d	umenta (E)	-	2	indefinido	n/d	comp89070_c0_seq1	PhNAC074	-	-
AT1G56010	ANAC021; ANAC022; NAC1	NAC-d	umenta (E)	umenta	2,3,17	indefinido	n/d	comp89070_c0_seq1	PhNAC074	-	-
AT5G18270	ANAC087	NAC-d	umenta (E)	umenta	1,2,3,17	indefinido	n/d	comp9709_c0_seq1 (P)	PhNAC058	comp520856_c0_seq1 (P)	PhNAC030
AT3G04060 (*)	ANAC046; NAC046	NAC-d	umenta (E)	umenta	1,2,3,17	promueve	10	comp9709_c0_seq1 (P)	PhNAC058	comp520856_c0_seq1 (P)	PhNAC030
AT5G61430	ANAC100; NAC100	NAC-d	umenta (M)	-	1,2,3	indefinido	n/d	comp22005_c0_seq3	PhNAC017	-	-
AT5G39610 (*)	ANAC092; NAC6; ORE1	NAC-d	umenta (E)	umenta	1,2,3,17	promueve	11	comp22005_c0_seq3	PhNAC017	-	-
AT3G29035 (*)	ANAC059; ORS1	NAC-d	umenta (E)	umenta	1,2,3,17	promueve	12	comp22005_c0_seq3	PhNAC017	-	-
AT1G54330	ANAC020; NAC020	NAC-b	umenta	disminuye	4,17	indefinido	n/d	comp22839_c0_seq1	PhNAC025	-	-
AT3G17730	ANAC057; NAC057	NAC-b	disminuye	disminuye	3,4,17	indefinido	n/d	comp22839_c0_seq1	PhNAC025	-	-
AT5G22290	ANAC089; NAC089; FSQ6	NAC-b	umenta (E)	-	1,2,3	indefinido	n/d	comp18132_c0_seq1 (P)	PhNAC099	-	-
AT5G64060	ANAC103; NAC103	NAC-b	umenta (E)	-	2	indefinido	n/d	comp12410_c0_seq1 (P)	PhNAC094	comp33776_c0_seq1 (P)	PhNAC093
AT1G32870	ANAC013; NAC13	NAC-b	umenta (E)	-	2,3	indefinido	n/d	comp14368_c0_seq1	PhNAC105	-	-
AT1G34190	ANAC017; NAC017; RAO2	NAC-b	umenta (E)	umenta	2,3,17	indefinido	n/d	comp14368_c0_seq1	PhNAC105	-	-
AT1G34180 (*)	ANAC016; NAC016	NAC-b	umenta (E)	-	1,2,3	promueve	13	comp14368_c0_seq1	PhNAC105	-	-
AT5G04410	ANAC078; NAC2	NAC-b	umenta (E)	disminuye	2,3,17	indefinido	n/d	comp26387_c0_seq2	PhNAC050	comp26387_c0_seq6	PhNAC096
AT3G10500 (*)	ANAC053; NAC053; NTL4	NAC-b	umenta (M)	-	1,2,3	promueve	14,15	comp26387_c0_seq2	PhNAC050	comp26387_c0_seq6	PhNAC096
AT3G10490	ANAC051; ANAC052	NAC-b	umenta (E)	umenta	2,3,17	indefinido	n/d	comp20693_c0_seq1	PhNAC095	-	-
AT4G35580 (*)	CBNAC; NTL9	NAC-b	umenta	umenta	1,3,17	promueve	16	comp32221_c0_seq1	PhNAC023	comp7749_c0_seq1	PhNAC059
AT3G49530	ANAC062; NAC062	NAC-b	umenta (E)	disminuye	2,17	indefinido	n/d	comp32221_c0_seq1	PhNAC023	comp7749_c0_seq1	PhNAC059
AT3G04420	ANAC048	NAC-b	umenta (E)	-	2,4	indefinido	n/d	-	-	-	-
AT1G02220	ANAC003; NAC003	NAC-b	umenta (L)	-	1,2,3	indefinido	n/d	-	-	-	-
AT1G02250	ANAC005; BAC005	NAC-b	umenta (M)	-	2	indefinido	n/d	-	-	-	-

**Tabla 1.** Expresión y anotación funcional en senescencia foliar de genes *SAG* y *SDG* de la familia NAC de *Arabidopsis* y sus putativos ortólogos en *P. hybrida*. Lista de los 41 genes seleccionados de *A. thaliana* mostrando su expresión en hojas y en pétalos y su función regulatoria en la senescencia foliar. Los genes están clasificados en subfamilias. Los putativos ortólogos fueron obtenidos mediante tBLASTn utilizando un repositorio de genes que se expresan en las hojas de *P. hybrida* (González et al., 2017; Villarino et al., 2014). Los asteriscos (\*) indican miembros de *Arabidopsis* con función reportada en senescencia foliar. La letra (P) indica secuencias parciales de *P. hybrida*. (E), (M), (L), indican cambios de expresión tempranos, intermedios o tardíos, respectivamente. Los genes AT3G04420, AT1G02220 y AT1G02250 no poseen ortólogos en *P. hybrida*. Los números 1 a 18 indican las referencias de la presente tabla: 1) Buchanan-Wollaston et al, 2005; 2) Breeze et al., 2011; 3) *Arabidopsis eFP browser* (Winter et al., 2007); 4) *Leaf senescence database* (Liu et al., 2011); 5) Hickman et al., 2013; 6) Garapati et al., 2015; 7) Guo y Gan, 2006; 8) Yang et al., 2011; 9) Wu et al., 2012; 10) Oda-Yamamizo et al., 2016; 11) Kim et al., 2009; 12) Balazadeh et al., 2011; 13) Kim et al., 2013; 14) Lee et al., 2012; 15) Lee et al., 2014; 16) Yoon et al., 2008; 17) Wagstaff et al., 2009. AGI, *Arabidopsis Genome Initiative*; n/d, no disponible.



En relación a la familia *WRKY* de *Arabidopsis*, los 28 candidatos asociados a senescencia que fueron seleccionados aumentan su expresión durante la senescencia foliar. Seis de ellos representan proteínas que regulan la senescencia foliar de acuerdo a lo reportado en la literatura (Tabla 2). Nueve de los 28 genes aumentan su expresión de manera temprana (E) mientras que 12 lo hacen en un estadio intermedio del proceso (M) y solo uno en las etapas tardías (L) (Tabla 2). Al analizar los cambios de expresión en los pétalos, se observó que 24 de ellos también aumentan durante el desarrollo de las flores (Tabla 2). Estos datos indican que la mayoría de los genes *WRKY* seleccionados cambian su expresión en estadios temprano-intermedios de la senescencia. Además, casi la totalidad de los genes que cambian su expresión en las hojas también presentan cambios de expresión durante la senescencia que ocurre en los pétalos, por lo que podrían estar participando en la regulación de la senescencia floral en *Arabidopsis*. Sorpresivamente no se encontraron miembros de la familia *WRKY* de *Arabidopsis* que disminuyan su expresión durante el desarrollo de las hojas y de los pétalos (Tabla 2).

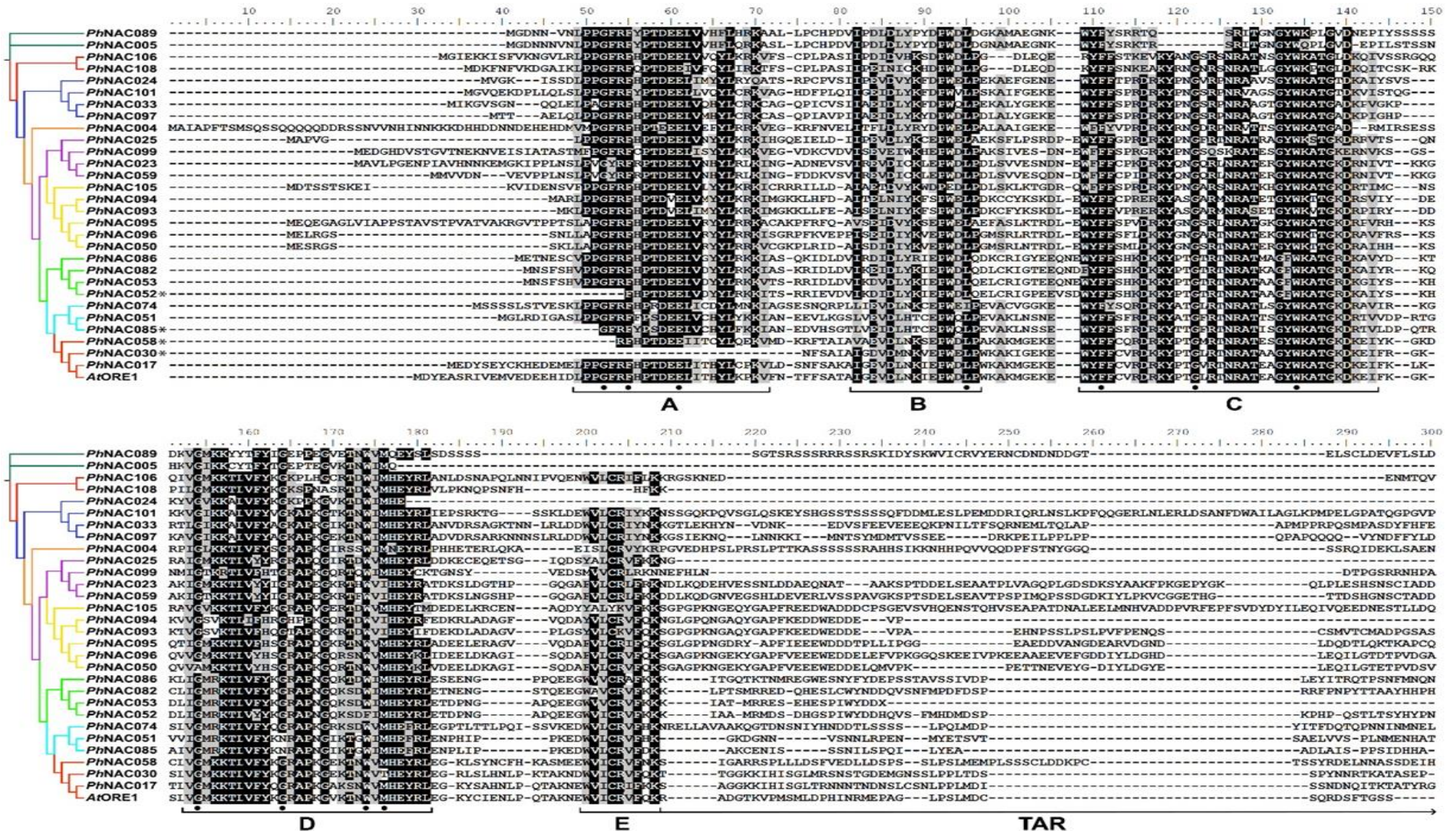
<i>Arabidopsis thaliana</i>								<i>Petunia hybrida</i>	
Código AGI	Sinónimo	Subfamilia	Expresión en hojas	Expresión en pétalos	Refs	Función en senescencia foliar	Refs	Mejor entrada	Sinónimo
AT5G24110 (*)	WRKY030	WRKY-III	umenta (M)	umenta	2,4,5	promueve	6	comp730638_c0_seq1 (P)	PhWRKY030
AT1G66600	WRKY063	WRKY-III	umenta	-	3	indefinido		comp21623_c0_seq1	PhWRKY063
AT2G03340	WRKY003	WRKY-I	umenta (E)	no cambia	2,4	indefinido		comp22104_c1_seq3	PhWRKY004
AT1G13960	WRKY004	WRKY-I	umenta (E)	umenta	1,2,4,5	indefinido		comp22104_c1_seq3	PhWRKY004
AT5G07100	WRKY026	WRKY-I	umenta (E)	umenta	1,2,4,5	indefinido		comp30812_c0_seq1	PhWRKY024
AT4G01720	WRKY047	WRKY-IIb	umenta (E)	umenta	2,4,5	indefinido		comp6646_c0_seq1	PhWRKY006
AT1G29280	WRKY065	WRKY-IIe	umenta (M)	umenta	2,4,5	indefinido		comp18538_c0_seq1 (P)	PhWRKY069
AT2G23320	WRKY015	WRKY-IId	umenta (M)	umenta	2,4,5	indefinido		comp21369_c0_seq2	PhWRKY015
AT4G26440	WRKY034	WRKY-I	umenta (M)	umenta	2,4,5	indefinido		comp12645_c0_seq1	PhWRKY002
AT5G13080 (*)	WRKY075	WRKY-IIb	umenta (M)	umenta	1,2,4,5	promueve	7	comp23620_c0_seq2	PhWRKY075
AT3G58710	WRKY069	WRKY-IIe	umenta (E)	umenta	2,4,5	indefinido		comp18538_c0_seq1 (P)	PhWRKY069
AT2G30250	WRKY025	WRKY-I	umenta (E)	umenta	2,4,5	indefinido		comp30812_c0_seq1	PhWRKY024
AT5G15130	WRKY072	WRKY-IIb	umenta (L)	umenta	2,4,5	indefinido		comp16919_c0_seq1	PhWRKY072
AT1G18860	WRKY061	WRKY-IIb	umenta (M)	no cambia	2,4	indefinido		comp6646_c0_seq1	PhWRKY006
AT1G62300 (*)	WRKY006	WRKY-IIb	umenta (M)	umenta	1,2,4,5	promueve	8	comp6646_c0_seq1	PhWRKY006
AT5G64810	WRKY051	WRKY-IIc	umenta (M)	-	2	indefinido		comp2525_c0_seq1 (P)	PhWRKY051
AT4G31550	WRKY011	WRKY-IId	umenta	no cambia	3,4	indefinido		comp17118_c0_seq4	PhWRKY011
AT4G24240	WRKY007	WRKY-IId	umenta	umenta	3,4,5	indefinido		comp22664_c0_seq2	PhWRKY007
AT3G01080	WRKY058	WRKY-I	umenta	umenta	3,4,5	indefinido		comp22104_c1_seq3	PhWRKY004
AT4G18170	WRKY028	WRKY-IIc	umenta (M)	umenta	2,4,5	indefinido		comp325234_c0_seq1	PhWRKY028
AT2G40740	WRKY055	WRKY-III	umenta (M)	umenta	2,4,5	indefinido		comp15947_c0_seq2 (P)	PhWRKY055
AT2G38470	WRKY033	WRKY-I	umenta (M)	umenta	2,4,5	indefinido		comp23620_c0_seq3	PhWRKY033
AT4G23810 (*)	WRKY053	WRKY-III	umenta (M)	umenta	2,4,5	promueve	9	comp42882_c0_seq1	PhWRKY053
AT5G49520	WRKY048	WRKY-IIc	umenta (E)	umenta	2,4,5	indefinido		comp266655_c0_seq1 (P)	PhWRKY023
AT3G01970	WRKY045	WRKY-I	umenta (E)	umenta	1,2,4,5	indefinido		comp23620_c0_seq2	PhWRKY075
AT1G69810	WRKY036	WRKY-IIb	umenta (E)	umenta	2,4,5	indefinido		comp6646_c0_seq1	PhWRKY006
AT2G40750 (*)	WRKY054	WRKY-III	umenta	umenta	3,4,5	retrasa	6	comp933645_c0_seq1	PhWRKY054
AT3G56400 (*)	WRKY070	WRKY-III	umenta	umenta	3,4,5	retrasa	6	comp26279_c1_seq2	PhWRKY070

**Tabla 2.** Expresión y anotación funcional en senescencia foliar de genes SAG de la familia WRKY de *Arabidopsis* y sus putativos ortólogos en *P. hybrida*. Lista de los 28 genes seleccionados de *A. thaliana* mostrando su expresión en hojas y en pétalos y su función regulatoria en la senescencia foliar. Los genes están clasificados en subfamilias según Eulgem *et al.* 2000. Los putativos ortólogos fueron obtenidos mediante tBLASTn utilizando un repositorio de genes que se expresan en las hojas de *P. hybrida* (González *et al.*, 2017; Villarino *et al.*, 2014). Los asteriscos (\*) indican miembros de *Arabidopsis* con función reportada en senescencia foliar. La letra (P) indica secuencias parciales de *P. hybrida*. (E), (M), (L), indican cambios de expresión tempranos, intermedios o tardíos, respectivamente. Los números 1 a 10 indican las referencias de la presente tabla: 1) Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; 2) Breeze *et al.*, 2011; 3) *Leaf senescence database* (Liu *et al.*, 2011); 4) *Arabidopsis eFP browser* (Winter *et al.*, 2007); 5) Wagstaff *et al.*, 2009; 6) Besseau *et al.*, 2012; 7) Li *et al.*, 2013; 8) Robatzek y Somssich, 2002; 9) Miao *et al.*, 2004. AGI, *Arabidopsis Genome Initiative*.

Una vez seleccionados los genes asociados a senescencia de ambas familias de FTs de Arabidopsis, se buscaron los putativos genes ortólogos en petunia. Para ello, se generó un repositorio de secuencias de *Petunia x hybrida* cv. 'Mitchell Diploid' para poder correr BLAST a partir de un transcriptoma foliar (RNAseq) disponible en el dominio público (Villarino *et al.*, 2014; González *et al.*, 2017). Aplicando esta herramienta, a partir de las secuencias de las 41 proteínas seleccionadas de Arabidopsis de la familia NAC, se obtuvieron las secuencias de cDNA de 29 genes en *P. hybrida* (*PhNACs*) (Tabla 1). Un total de 21 resultaron ser los mejores resultados de la búsqueda por tBLASTn (mejor entrada), mientras que 8 de ellos fueron entradas de menor orden para algunos genes de Arabidopsis (Anexo 1), pero que mostraron buenos valores de *e-value* e identidad, y por lo tanto fueron sumados a la lista de putativos ortólogos en *P. hybrida* (Tabla 1). De la misma manera, para las 28 proteínas seleccionadas de la familia WRKY de Arabidopsis, se obtuvieron las secuencias de ADNc de 20 genes en *P. hybrida* (*PhWRKYs*) (Tabla 2). Todas las secuencias de los *PhWRKY* encontradas resultaron ser los mejores resultados de la búsqueda por tBLASTn (mejor entrada), sin encontrarse entradas de menor orden relevantes (Anexo 2).

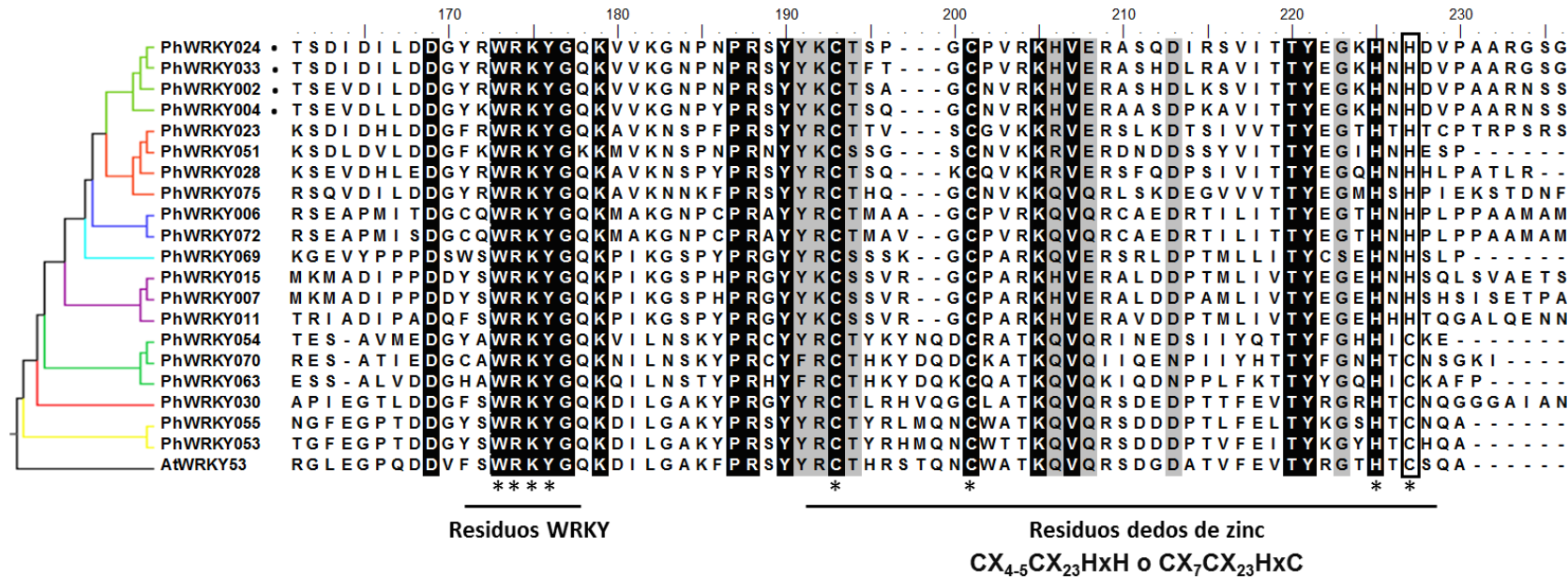
Al momento de realizar las búsquedas, aún no se encontraba disponible en el dominio público genomas secuenciados de *P. hybrida* ni de especies del género *Petunia*. Por lo tanto, el transcriptoma foliar publicado por Villarino *et al.* (2014) fue la mejor representación de secuencias de *P. hybrida*. Además, dicho transcriptoma tenía la ventaja de representar genes que se expresan en las hojas. Los genomas versión borrador (*draft*) de los parentales de *P. hybrida* (*P. axillaris* y *P. inflata*, Bombarely *et al.*, 2016) se liberaron al momento en que los resultados ya habían sido analizados. De todas maneras, se realizaron alineamientos locales a través de BLAST en los genomas de los parentales en *Sol Genomics Network* (<https://solgenomics.net/>) y las secuencias recuperadas presentaron valores de *e-value* e identidad similares a aquellas recuperadas del transcriptoma foliar de *P. hybrida* para ambas familias de factores de transcripción (Anexo 1 y 2). Los análisis de alineamientos locales (BLAST) nos permitieron identificar los putativos ortólogos de las familias NAC y WRKY en *P. hybrida*, así como en sus parentales, con valores de identidad superiores al 50% en la mayoría de los casos, lo que indicaría un grado de conservación considerable entre ambas especies.

Con el objetivo de confirmar que los genes identificados en *P. hybrida* codifican para proteínas de las familias NAC y WRKY, las secuencias nucleotídicas obtenidas para cada familia fueron traducidas en los 6 marcos de lectura posibles utilizando el programa *ORF-finder* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Una vez obtenidas las secuencias proteicas predichas, las porciones de la región N-terminal conteniendo los residuos altamente conservados característicos de cada familia fueron sujetas a alineamientos múltiples. Las proteínas de Arabidopsis, AtORE1 y AtWRKY53 se incluyeron en los alineamientos como referencia de la familia NAC y WRKY respectivamente. Para todas las proteínas de la familia NAC el alineamiento identificó las regiones conservadas que definen los cinco subdominios (A-E) presentes en el dominio NAC (Ooka *et al.*, 2003); confirmando que las proteínas identificadas en *P. hybrida* son FTs de dicha familia (Fig. 6).



**Figura 6.** Alineamiento múltiple de las secuencias PhNAC identificadas. Alineamiento realizado por el programa ClustaW de los residuos altamente conservados de la región N-terminal (dominio NAC) de las 29 proteínas identificadas en *P. hybrida*, y una porción de la región C-terminal divergente que forma parte del TAR (*Trans-Activation Region*). La proteína NAC de Arabidopsis, AtORE1, fue incluida como referencia en los alineamientos (Kim *et al.*, 2009). Los residuos altamente conservados están coloreados en negro y gris y definen los cinco subdominios (A-E) presentes en el dominio NAC. Los puntos indican aminoácidos altamente conservados presentes en secuencias NAC de *A. thaliana* y arroz (Ooka *et al.*, 2003). Los asteriscos indican cuatro secuencias parciales que carecen de la primera porción del extremo N-terminal.

De la misma manera el alineamiento de las proteínas de la familia WRKY identificó la región de residuos WRKY y las estructuras de dedos de zinc características de la familia (Eulgem *et al.*, 2000), confirmando que las proteínas identificadas en *P. hybrida* son FTs de dicha familia (Fig. 7).



**Figura 7.** Alineamiento múltiple de las secuencias PhWRKY identificadas. Alineamiento realizado por el programa ClustalW de los residuos altamente conservados de la región N-terminal conteniendo el dominio WRKY de las 20 proteínas identificadas en *P. hybrida*. Los residuos altamente conservados están coloreados en negro y gris. Los asteriscos (\*) y el recuadro negro indican los residuos WRKY y los aminoácidos que conforman los dedos de zinc. Los puntos negros muestran aquellas proteínas pertenecientes a la subfamilia WRKY-I las cuales contienen un segundo grupo de residuos WRKY que no se muestran en la figura. La proteína WRKY de Arabidopsis, AtWRKY53, fue incluida como referencia en los alineamientos (Miao *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos permitieron obtener las secuencias de los putativos ortólogos de aquellos miembros asociados a la senescencia de las familias NAC y WRKY en *P. hybrida*, útiles para su posterior análisis transcripcional en los distintos tipos de senescencia que fueron caracterizados en el Capítulo 1.

## CAPÍTULO 3

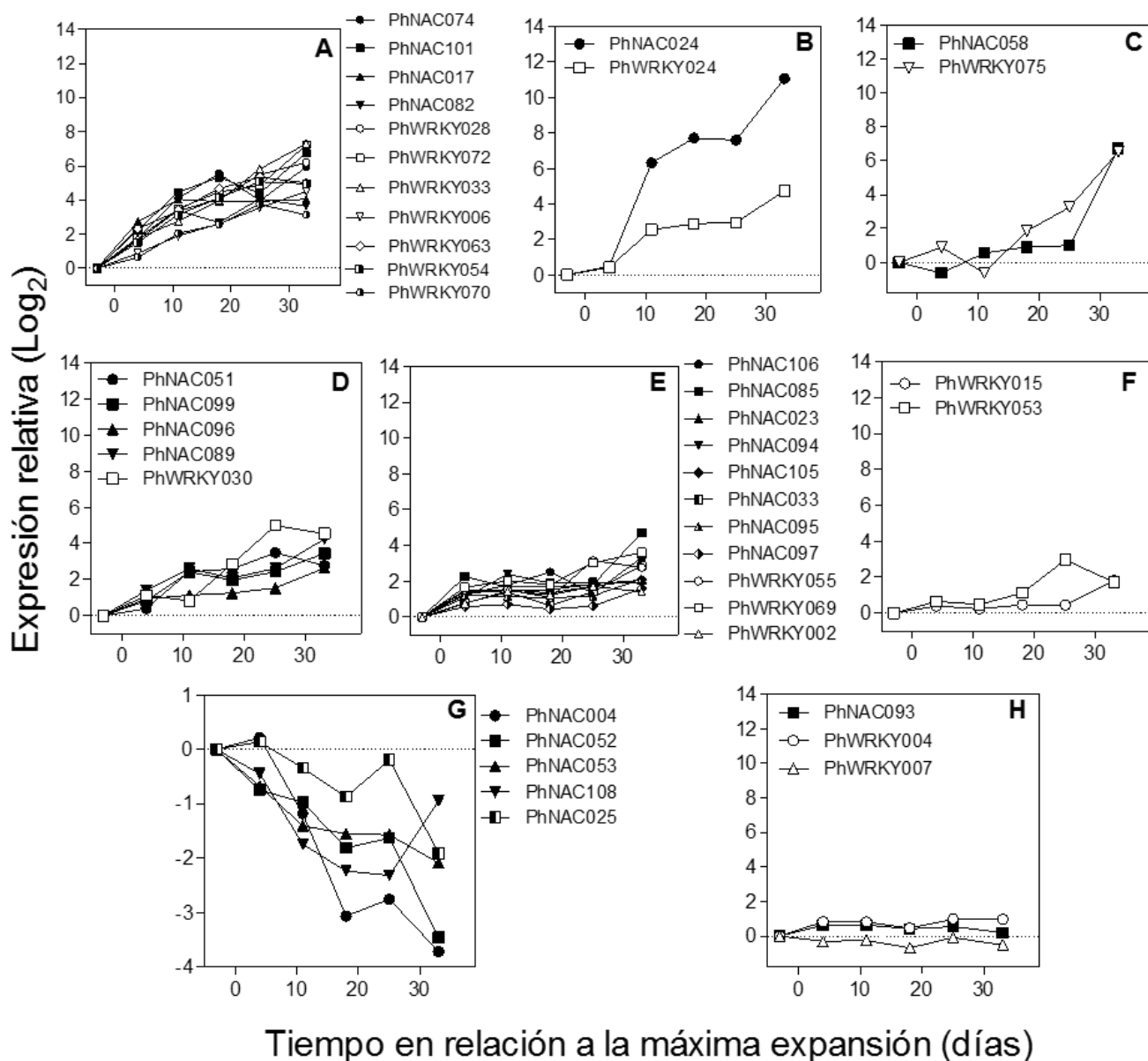
### **Análisis de expresión de genes *PhNAC* y *PhWRKY* en tres procesos de senescencia en *P. hybrida***

Con el objetivo de identificar si los FTs obtenidos de las familias NAC y WRKY cambian su expresión a lo largo de la senescencia en petunia, se analizó su expresión por qPCR en los tres tipos de senescencia caracterizados en el Capítulo 1: Senescencia Natural de las Hojas (SNH), Senescencia Natural de los Pétalos (SNP) y Senescencia de los pétalos Inducida por Polinización (SIP).

Para evaluar la SNH, los perfiles de expresión de los genes *PhNAC* y *PhWRKY* fueron medidos en seis momentos diferentes del desarrollo foliar (días -3, 4, 11, 18, 25 y 33, en relación a la máxima expansión foliar). De los 29 genes *PhNAC* identificados, 24 fueron detectados en las hojas, 23 de los cuales mostraron cambios significativos de expresión (Fig. 8). Por otro lado, de los 20 genes *PhWRKY* identificados, 17 fueron detectados en las hojas, y 15 de ellos presentaron cambios diferenciales en su expresión (Fig. 8). Los genes *PhNAC086*, *PhNAC005*, *PhNAC030*, *PhNAC050*, *PhNAC059*, *PhWRKY011*, *PhWRKY051* y *PhWRKY023* no fueron detectados, aun utilizando secuencias de oligonucleótidos diferentes a los originalmente utilizados.

Para comparar e identificar patrones comunes y diferenciales de expresión en ambas familias, agrupamos dichos perfiles en *clusters* utilizando la herramienta *cmeans* (Pal *et al.*, 1996) del paquete de análisis R (Fig. 8). Los genes de ambas familias se clasificaron en 8 *clusters*, encontrándose inicialmente 2 grandes grupos: aquellos *clusters* conteniendo genes que aumentaron su expresión (Fig. 8A-F) y un *cluster* donde se agruparon genes con expresión disminuida (Fig. 8G). En el último *cluster* se muestran los genes que no presentaron cambios significativos en su expresión durante la progresión de la SNH (Fig. 8H). El *cluster* de la Fig. 8A presentó uno de los grupos más interesantes del análisis ya que contiene 11 genes de ambas familias que incrementaron su expresión desde estadios tempranos hasta alcanzar cambios medio-altos. De manera similar, el *cluster* de la Fig. 8B constituido por *PhNAC024* y *PhWRKY024*, presentó patrones de expresión con cambios relativamente tempranos y elevados, particularmente *PhNAC024* alcanza el máximo cambio de expresión de todo el análisis. El *cluster* de la Fig. 8C, constituido por *PhNAC058* y *PhWRKY075*, presentó cambios de expresión medio-altos, aunque en etapas tardías. Luego, los *clusters* de las figuras 8D-F presentaron genes de ambas familias con niveles de expresión medio-bajos, y en general con cambios significativos en etapas intermedia-tardías del proceso. Finalmente, el *cluster* de la Fig. 8G compuesto por 5 genes que disminuyeron considerablemente su expresión, únicamente presentó miembros de la familia NAC y los cambios se produjeron en etapas tempranas del proceso. Los resultados mostraron perfiles de expresión consistentes para ambas familias y nos permitieron identificar a los genes de los *clusters* de las

Figs. 8A-C como candidatos a participar en la regulación de este proceso, ya que fueron los que presentaron cambios de expresión en etapas relativamente tempranas y niveles de expresión considerables y en caso de hacerlo en etapas más tardías, lo hicieron con una expresión elevada.



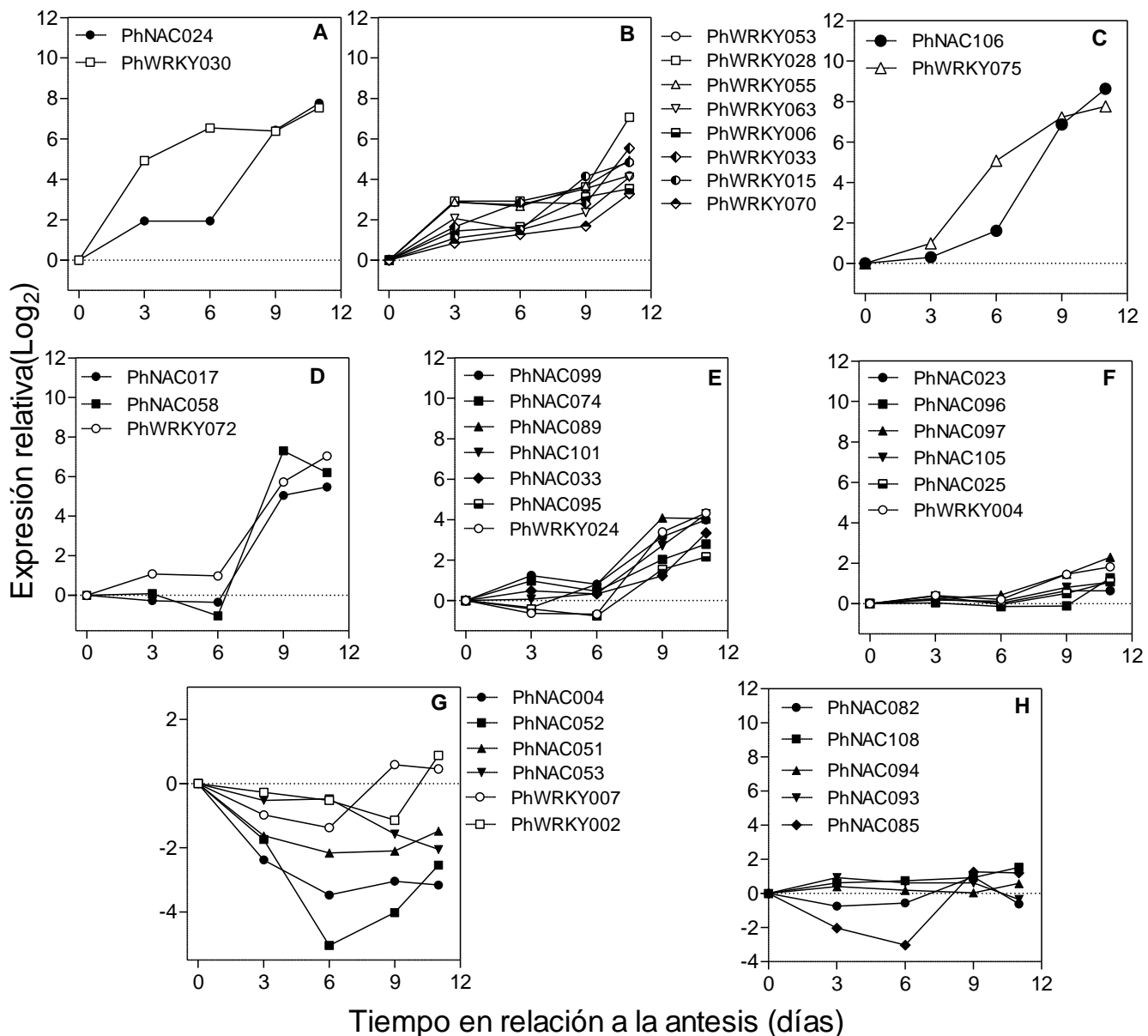
**Figura 8.** Perfiles de expresión de los genes *PhNAC* y *PhWRKY* durante la senescencia natural en hojas (SNH). (A-G) Agrupamientos en *clusters* de los genes evaluados. (H) Grupo de genes sin expresión diferencial. Los niveles relativos de cada transcrito son mostrados como la relación (Log<sub>2</sub>) entre cada punto de muestreo y su primer punto de muestreo y normalizados a la expresión del gen de referencia *PhEF1a*. Los datos fueron sometidos a ANOVA de un factor seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras de error fueron eliminadas para una mejor visualización. Los análisis estadísticos se muestran en el Anexo 5.

Similarmente, los perfiles de expresión de los genes *PhNAC* y *PhWRKY* que fueron detectados en las hojas, fueron evaluados en la SNP en cinco momentos diferentes del desarrollo de los pétalos, desde la antesis (día 0) hasta el marchitamiento de las corolas (días 0, 3, 6, 9 y 11). Los genes

*PhNAC086*, *PhNAC005*, *PhNAC030*, *PhNAC050*, *PhNAC059*, *PhWRKY011*, *PhWRKY051* y *PhWRKY023* no fueron medidos en los pétalos ya que no fueron detectados en hojas. Los perfiles de expresión de ambas familias fueron agrupados en *clusters* como se describió anteriormente (Fig. 9). De los 24 genes *PhNAC* detectados en las hojas, su totalidad fue detectada en los pétalos. Un total de 19 mostraron cambios significativos de expresión (Fig. 9). Por otro lado, de los 17 genes *PhWRKY* detectados en las hojas, 15 fueron detectados en los pétalos y todos ellos presentaron cambios significativos en su expresión (Fig. 9). Los genes *PhWRKY069* y *PhWRKY054* no fueron detectados en los pétalos.

Los perfiles de expresión se agruparon en 8 *clusters*, que al igual que en la SNH, se separaron en dos grandes grupos: aquellos *clusters* conteniendo genes que aumentaron su expresión (Fig. 9A-F) y un *cluster* donde se agruparon los genes con expresión disminuida (Fig. 9G). El último *cluster* presentó los genes que no tuvieron cambios de expresión significativa durante la SNP (Fig. 9H). El *cluster* de la Fig. 9A, compuesto por *PhNAC024* y *PhWRKY030*, presentó patrones de expresión con cambios muy elevados desde etapas iniciales del proceso, por lo que resultó uno de los *clusters* más interesantes del análisis. De manera similar, el *cluster* de la Fig. 9C constituido por *PhNAC106* y *PhWRKY075*, representó el segundo grupo más relevante ya que los cambios de expresión fueron muy altos, aunque en etapas más tardías que en el *cluster* de la Fig. 9A. El *cluster* de la Fig. 9B, formado por 7 miembros de la familia WRKY, mostró cambios de expresión medios en etapas relativamente tempranas del proceso. Los genes *PhNAC017*, *PhNAC058* y *PhWRKY072* del *cluster* de la Fig. 9D, presentaron cambios de expresión elevados, aunque en etapas tardías del proceso. Los *clusters* de las Figs. 9E y F presentaron genes de ambas familias con niveles de expresión bajo-medios y en general los cambios se observaron en etapas tardías. Finalmente, el *cluster* de la Fig. 9G se compuso por los 5 genes *PhNAC* que disminuyeron su expresión durante la SNH (Fig. 8G) y por los genes *PhWRKY007* y *PhWRKY002* que mostraron perfiles poco definidos (Fig. 9G). Al igual que en la SNH, los resultados mostraron perfiles de expresión consistentes para ambas familias y nos permitieron asociar a los genes de los *clusters* de las Figs. 9A-D como candidatos a participar en la regulación del proceso, ya que son los que presentaron cambios de expresión considerables en etapas relativamente tempranas, y aquellos que lo hicieron en etapas más avanzadas, pero con cambios muy elevados.



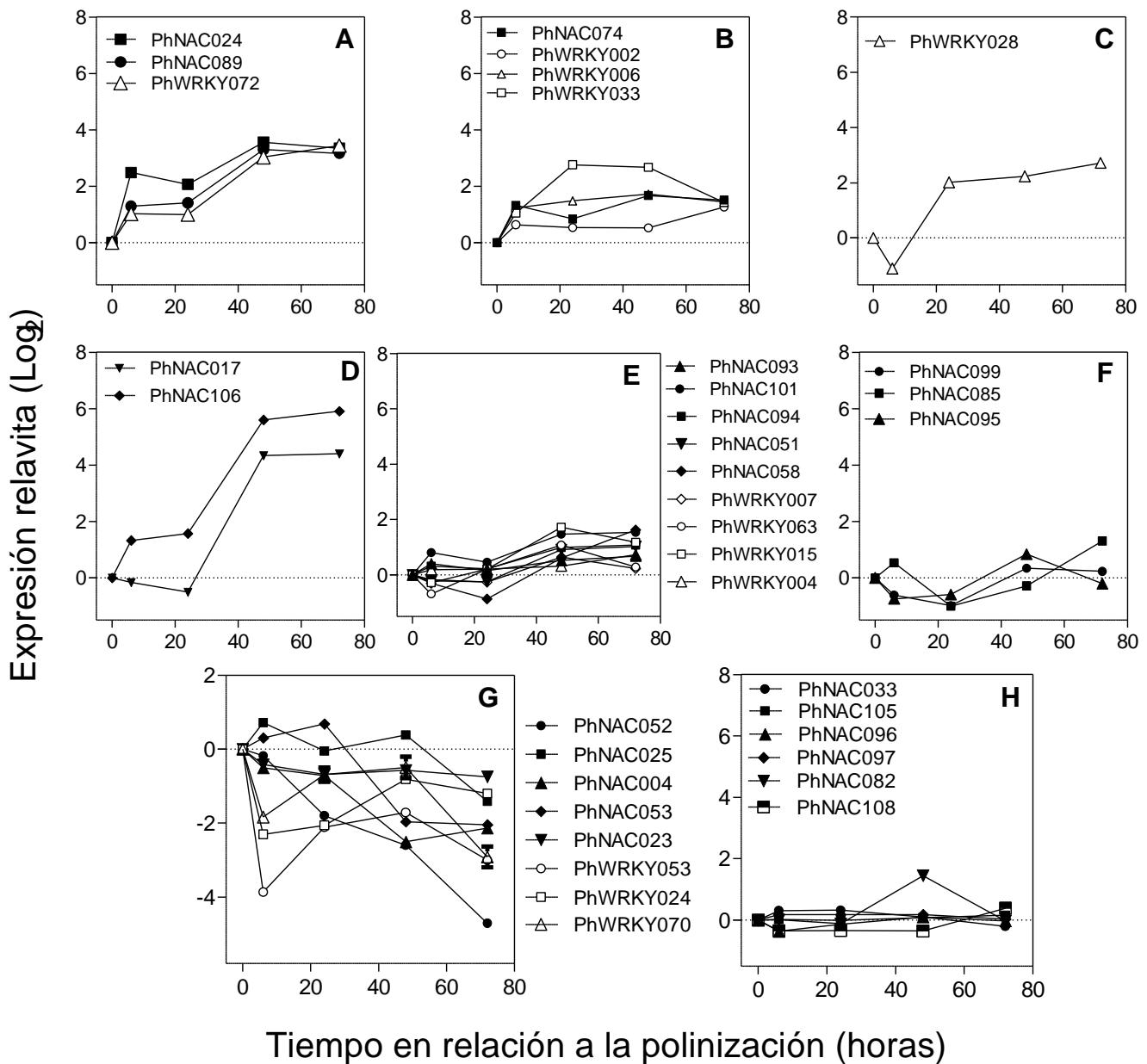


**Figura 9.** Perfiles de expresión de los genes *PhNAC* y *PhWRKY* durante la senescencia natural en pétalos (SNP). (A-G) Agrupamientos en *clusters* de los genes medidos según su perfil de expresión. (H) grupo de genes sin expresión diferencial. Los niveles relativos de cada transcripto son mostrados como la relación (Log2) entre cada punto de muestreo y su primer punto de muestreo y normalizados a la expresión del gen de referencia *PhEF1a*. Los datos fueron sometidos a ANOVA de un factor seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras de error fueron eliminadas para una mejor visualización. Los análisis estadísticos se muestran en el Anexo 5.

Para evaluar la senescencia de los pétalos inducida por polinización (SIP), los perfiles de expresión de los genes *PhNAC* y *PhWRKY* fueron medidos en cinco momentos diferentes desde el instante previo a la polinización (0 h), hasta el marchitamiento de las corolas luego de la polinización manual con polen maduro (6, 12, 24, 48 y 72 h). Al igual que en los análisis previos, los perfiles de expresión de ambas familias durante la SIP fueron agrupados en *clusters* (Fig. 10).

De manera similar a los resultados previamente descritos, se identificaron *clusters* con genes que aumentaron y *clusters* con genes que disminuyeron su expresión durante la progresión de la SIP (Fig. 10 A-G). En el *cluster* de la Fig. 10H se muestran los genes que no tuvieron cambios de expresión significativos a lo largo de este tipo de senescencia. De los 24 genes *PhNAC* detectados en las hojas, todos fueron detectados en los pétalos durante el transcurso de la SIP, 18 de los cuales mostraron cambios significativos de expresión (Fig. 10). Por otro lado, de los 17 genes *PhWRKY* detectados en las hojas, 12 fueron detectados en los pétalos de flores polinizadas, todos ellos con cambios diferenciales en su expresión (Fig. 10). Los genes *PhWRKY055*, *PhWRKY030*, *PhWRKY075*, *PhWRKY069* y *PhWRKY054* no fueron detectados.

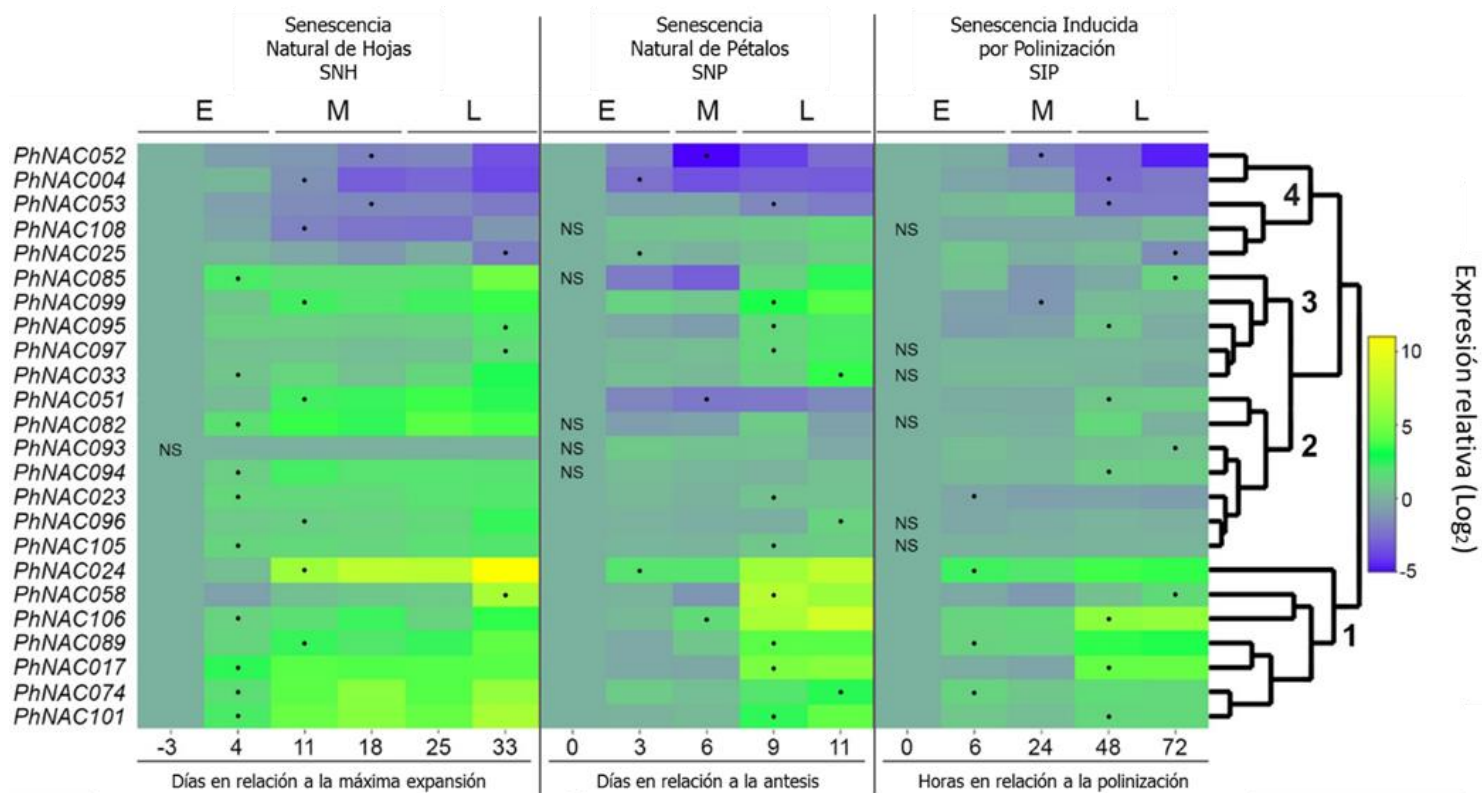
El *cluster* de la Fig. 10A compuesto por genes que aumentaron su expresión, *PhNAC089*, *PhNAC024* y *PhWRKY072*, presentó cambios medios en las etapas iniciales del proceso, por lo que resultó uno de los grupos más interesantes junto con el *cluster* de la Fig. 10D, conformado por los genes *PhNAC106* y *PhNAC017*, donde los cambios de expresión fueron aún mayores, aunque en etapas más tardías del proceso. Los *clusters* de las Figs. 10B-C formados por *PhNAC074*, *PhWRKY002*, *PhWRKY003*, *PhWRKY033* y *PhWRKY028*, mostraron aumentos de expresión bajo-medios desde etapas tempranas e intermedias de la SIP. De la misma manera, los *clusters* de las Figs. 10E-F están conformados por genes con niveles de expresión bajos en etapas tempranas y aumentos leves en etapas más tardías. Finalmente, el *cluster* de la Fig. 10G compuesto por los 5 genes *NAC* que disminuyeron considerablemente su expresión durante la SNH y SNP (Fig. 8 y Fig. 9) y por los genes *PhWRKY053* y *PhWRKY024*. Al igual que en los análisis anteriores, los resultados en la SIP mostraron perfiles de expresión consistentes para algunos genes de ambas familias de FTs. Sin embargo, se observó que la cantidad de genes con expresión significativa disminuyó, especialmente para la familia WRKY. Los resultados permitieron asociar a los genes de los *clusters* de las Figs. 10A-D como candidatos a participar en la regulación de este proceso.



### Análisis *heatmap* para determinar la participación simultánea de los genes *PhNAC* y *PhWRKY* en los tres procesos de senescencia

Con el objetivo de visualizar de manera simultánea la participación de cada familia de FTs durante la progresión de los tres tipos de senescencia estudiados, se realizó un análisis *heatmap* de los perfiles de expresión de cada familia (Figs. 11-12).

Para la familia NAC, si bien los 24 genes fueron detectados en los tres tipos de senescencia, se produjo una reducción en la cantidad de miembros diferencialmente expresados, en donde en la SNH un total de 23 genes cambiaron su expresión, mientras que para la SNP y SIP el número disminuyó a 19 y 18 genes, respectivamente. La mayoría de los genes *NAC* mostraron cambios significativos desde etapas tempranas de la SNH (Fig. 11); mientras que en los tipos de senescencia que ocurren en los pétalos, los *PhNAC* mostraron cambios de expresión principalmente en etapas tardías (Fig. 11).

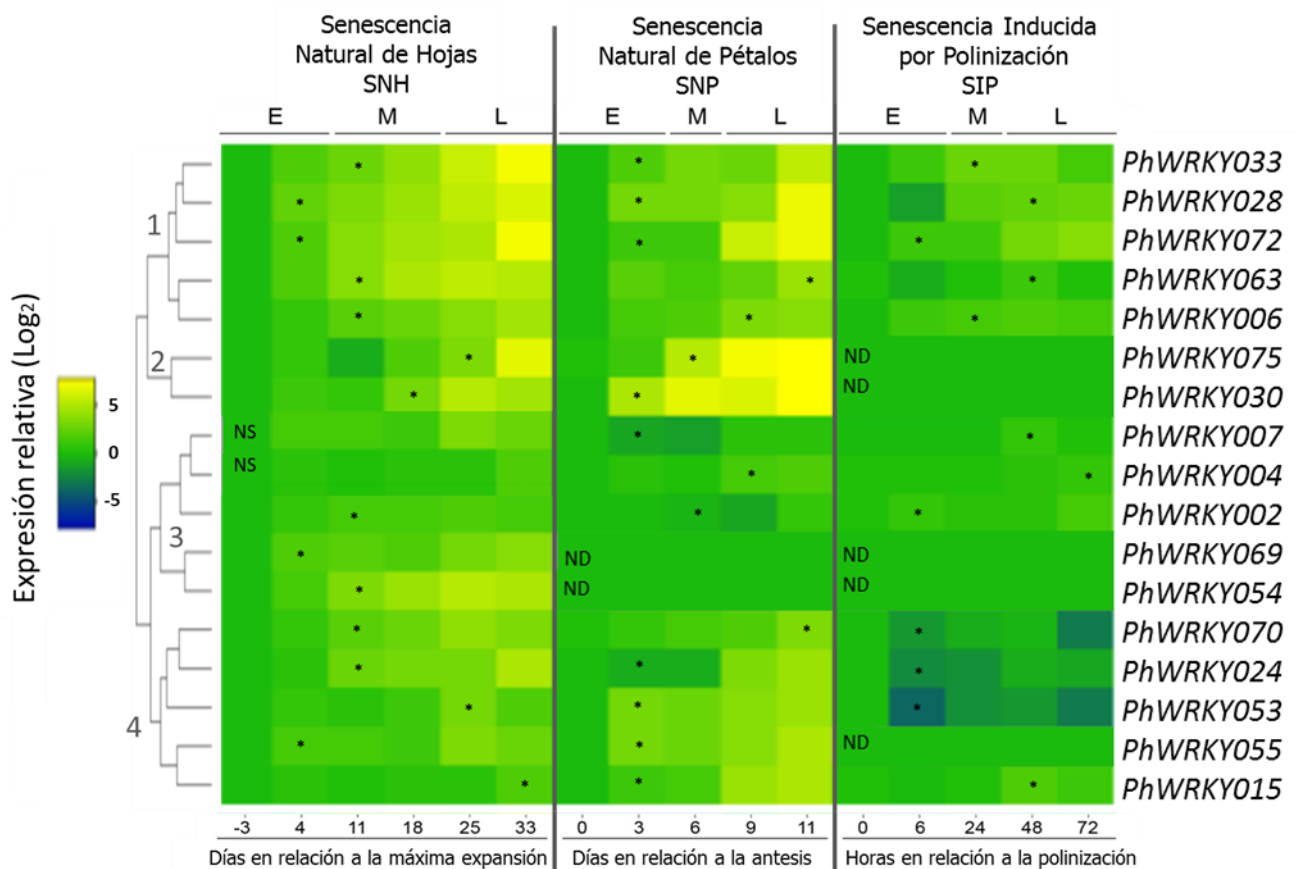


**Figura 11.** Análisis *heatmap* de los perfiles de expresión de los genes *PhNAC* en los tres tipos de senescencia estudiados. Los niveles de expresión se muestran en escala de colores como la relación (Log<sub>2</sub>) entre cada punto de muestreo y el primer punto de muestreo y normalizados a la expresión del gen de referencia *PhEF1a*. Los datos fueron sometidos a ANOVA de un factor seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Los puntos negros indican el momento inicial en que la expresión muestra diferencias significativas con respecto al primer punto de muestreo. E, M y L indican los estadios temprano, intermedio y tardío en los procesos de senescencia. NS indica aquellos genes que no presentaron cambios significativos en su expresión. Los análisis estadísticos se muestran en el Anexo 5.

El análisis permitió estimar la participación de cada gen *NAC* en los tres procesos de senescencia. El grupo 1, es el más interesante ya que está conformado por genes que aumentaron su expresión en los tres tipos de senescencia (*PhNAC024*, *PhNAC058*, *PhNAC106*, *PhNAC089*, *PhNAC017*, *PhNAC074* y *PhNAC101*). Seis de ellos aumentaron en etapas tempranas e intermedias de la SNH y en etapas tardías de la SNP. En la SIP, tres miembros de este grupo presentaron cambios de expresión desde etapas tempranas, mientras que los cuatro restantes lo hicieron en etapas tardías. El grupo 3 muestra los genes con un cambio de expresión diferencial principalmente en los procesos de senescencia natural (SNH y SNP; con excepción de *PhNAC085* que no mostró

diferencias significativas en la SNP), mientras que no parecerían estar muy implicados en la SIP. El grupo 2 se compone de genes principalmente asociados a la SNH con excepción de *PhNAC093*. El grupo 4 presenta tres miembros que disminuyeron su expresión en los tres tipos de senescencia (*PhNAC004*, *PhNAC052* y *PhNAC053*) y dos que disminuyeron preponderantemente en la SNH (Fig. 11).

El análisis para la familia WRKY mostró una reducción en el número de genes con expresión detectable en los distintos procesos, ya que para la SNH 17 genes fueron detectados, mientras que para la SNP y SIP el número disminuyó a 15 y 12 genes, respectivamente (Fig. 12). Además, observamos una activa participación en los procesos asociados a la senescencia natural, tanto en hojas como en pétalos (SNH y SNP), ya que la mayoría de los genes expresados en la SIP no mostraron cambios muy consistentes, sugiriendo que esta familia de FTs no estaría asociada a la regulación de este proceso en petunia (Fig. 12). A diferencia de los *PhNAC*, los *PhWRKY* presentaron una participación desde las etapas más intermedias de la SNH, mientras que los cambios de expresión en la SNP se produjeron desde etapas más tempranas, sugiriendo una alternancia en los tiempos de acción de ambas familias en los tipos de senescencia natural (Fig.12).



**Figura 12.** Análisis *heatmap* de los perfiles de expresión de los genes *PhWRKY* en los tres tipos de senescencia estudiados. Los niveles de expresión se muestran en escala de colores como la relación (Log2) entre cada punto de muestreo y el primer punto de muestreo y normalizados a la expresión del gen de referencia *PhEF1a*. Los datos fueron sometidos a ANOVA de un factor seguido de test de

comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Los puntos negros indican el momento inicial en que la expresión muestra diferencias significativas con respecto al primer punto de muestreo. E, M y L indican los estadios temprano, intermedio y tardío en los procesos de senescencia. NS indica aquellos genes que no presentaron cambios significativos en su expresión. ND indica aquellos genes que no fueron detectados. Los análisis estadísticos se muestran en el Anexo 5.

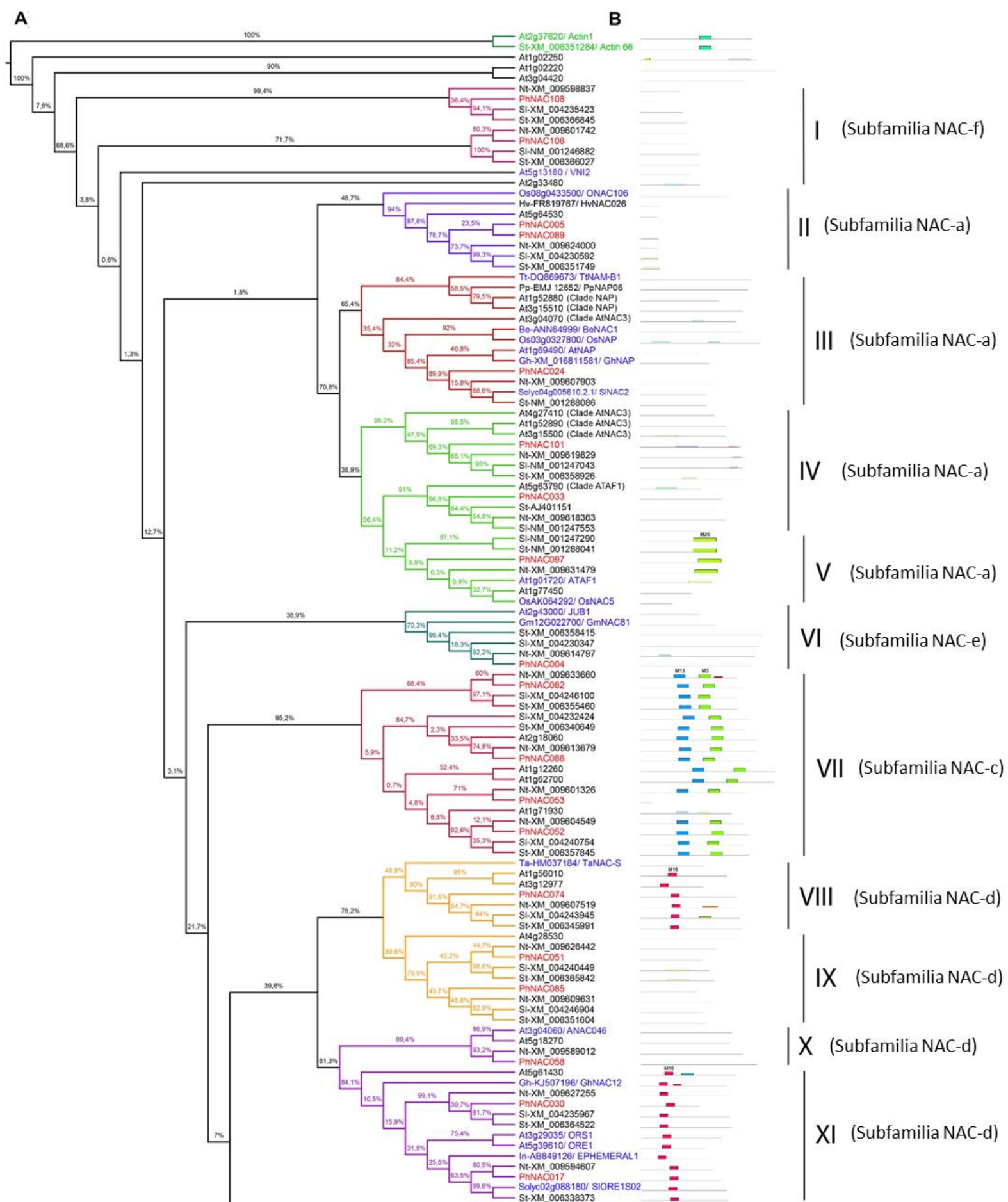
El grupo 1 está conformado por genes que aumentaron su expresión en los tres tipos de senescencia, aunque en la SIP los cambios de expresión no fueron muy contundentes como se mencionó previamente (Fig. 12). Este grupo, compuesto por los genes *PhWRKY033*, *PhWRKY028*, *PhWRKY072*, *PhWRKY063* y *PhWRKY006*, mostraron participación en general desde las etapas tempranas e intermedias. Los genes del grupo 2, *PhWRKY075* y *PhWRKY030*, se comportaron de manera similar al grupo 1, aunque no fueron detectados en la SIP. Los genes de ambos grupos presentaron los mejores cambios de expresión, por lo que serían los candidatos más fuertes para regular estos procesos (Fig. 12). El grupo 3 del análisis muestra aquellos genes con expresión diferencial preferentemente en las hojas o en los pétalos, pero no en ambos órganos. *PhWRKY004* y *PhWRKY007* no mostraron cambios significativos en la SNH y sus niveles de expresión no fueron consistentes en los pétalos, por lo que no parecen ser buenos candidatos. Por el contrario, *PhWRKY069* y *PhWRKY054*, no fueron detectables en los pétalos, pero presentaron expresión consistente en la SNH (Fig. 12). El grupo 4 está conformado por genes que presentaron cambios de expresión moderados en los tipos de senescencia natural (SNH y SNP) y tendieron a disminuir o presentaron cambios poco consistentes en la SIP (Fig. 12).

Los resultados de los *heatmaps* permitieron detectar con mayor claridad aquellos genes de cada familia que mostraron expresión robusta y en etapas tempranas en los tres tipos de senescencia estudiados. Aquellos genes que componen los grupos 1 y 3 de los *PhNAC* y los grupos 1 y 2 de los *PhWRKY* representarían los mejores candidatos a ser seleccionados para estudios funcionales que ayuden a determinar si tienen roles regulatorios en dichos procesos de senescencia.

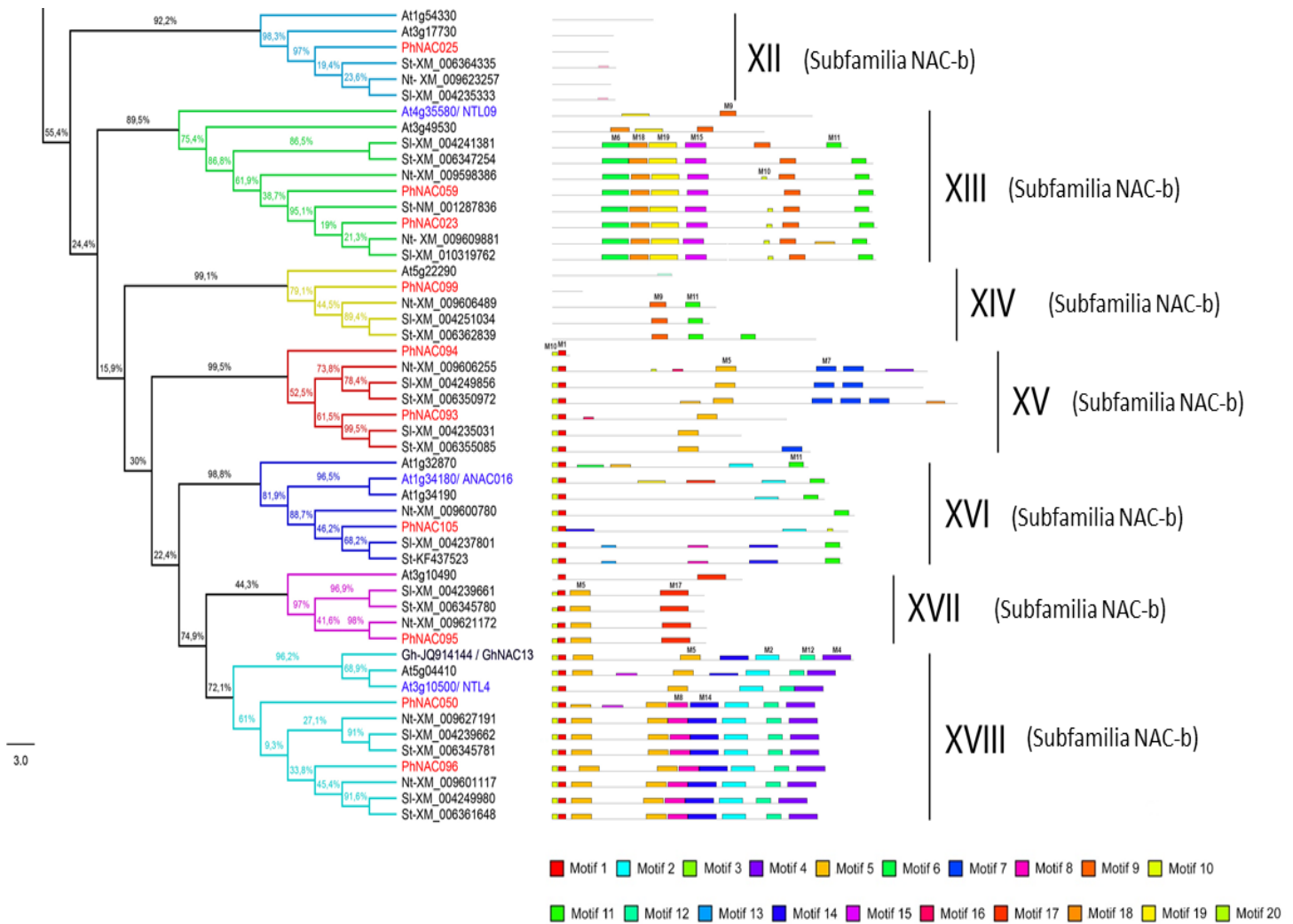
### **Análisis filogenéticos y construcción de grupos funcionales comparativos de miembros NAC y WRKY asociados a la senescencia**

Con el objetivo de seleccionar los mejores candidatos que podrían regular la senescencia en *P. hybrida*, se realizaron análisis filogenéticos utilizando el extremo N-terminal conservado de ambas familias de proteínas para evaluar la relación existente entre los *PhNAC* y *PhWRKY* con sus putativos ortólogos de *Arabidopsis* y de especies de solanáceas emparentadas con petunia (*Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum* y *Nicotiana tomentosiformis*). A su vez, se incluyeron proteínas NAC y WRKY de diversas especies que tienen función reportada en senescencia foliar, y un regulador de tipo NAC que promueve la senescencia en los pétalos de *Ipomoea nil* (InEPH1). Complementariamente, se realizó una búsqueda de motivos en la región C-terminal más variable

de ambas familias de proteínas, que se utiliza para estimar posibles similitudes funcionales entre miembros de distintas especies. La integración del análisis filogenético en conjunto con el análisis de motivos conservados, nos permitieron agrupar los PhNAC y PhWRKY en lo que se denominó “grupos funcionales” (Figs. 13-14). De esta manera, la presencia de una proteína con función reportada en senescencia en un determinado grupo funcional convierte a este grupo en un buen parámetro para estimar la participación en senescencia de sus miembros (Figs. 13-14). Los árboles filogenéticos mostraron una buena correlación entre el agrupamiento de las proteínas según las secuencias aminoacídicas de la región N-terminal en relación a las secuencias aminoacídicas presentes en los motivos conservados encontrados en la región C-terminal. De esta manera, 18 grupos funcionales fueron definidos para la familia NAC (Fig. 13) y 10 grupos funcionales fueron definidos para la familia WRKY (Fig. 14).

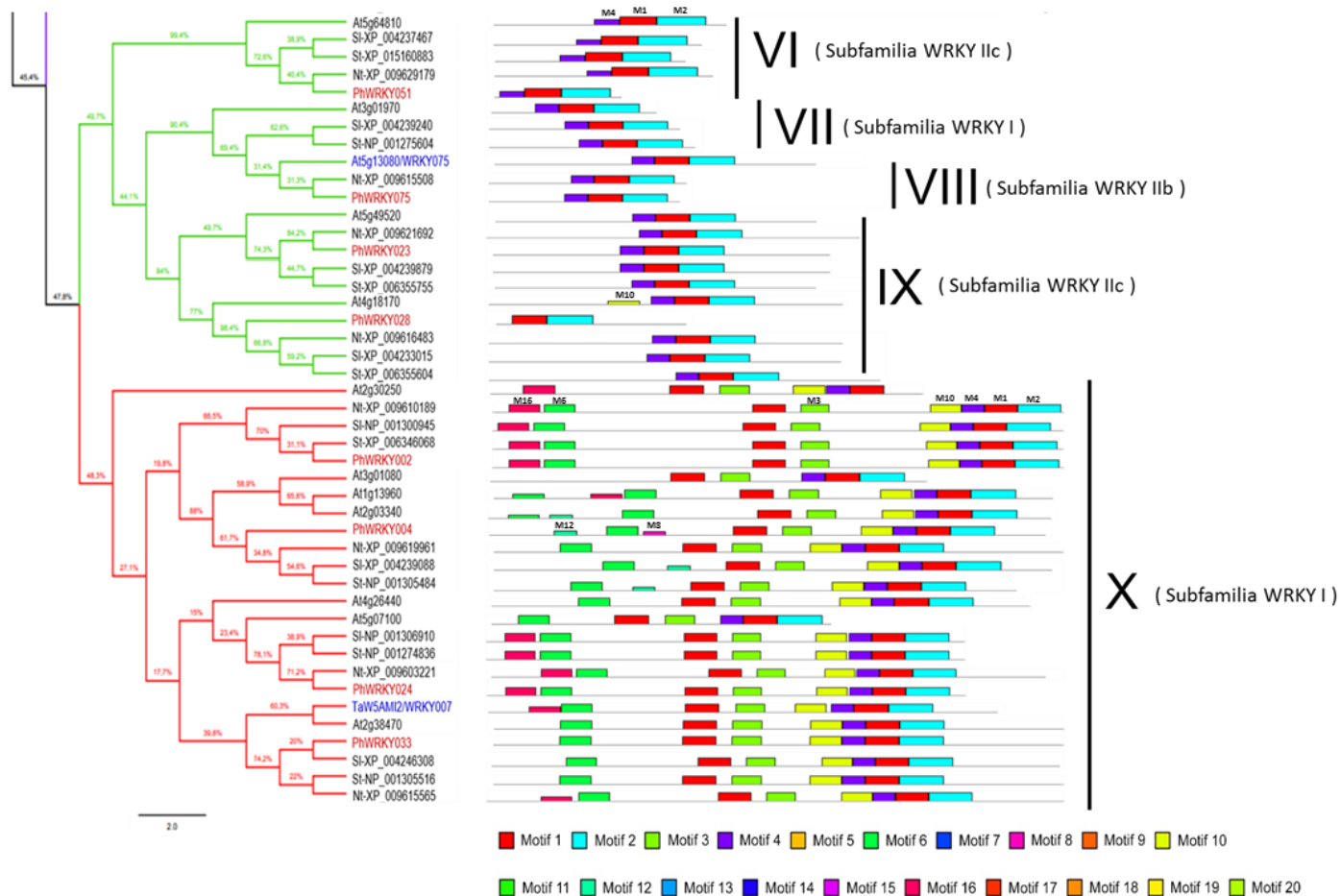






**Figura 13.** Relaciones filogenéticas e identificación de motivos conservados en el extremo C-terminal de proteínas NAC asociadas a senescencia en diferentes especies. (A) El árbol filogenético fue construido con el programa MEGA5 por el método *Neighbor Joining* a través del alineamiento múltiple del extremo conservado N-terminal de 161 proteínas NAC. Los valores de *bootstrap* (porcentajes) se encuentran en las ramas y están basados en un análisis de máxima verosimilitud utilizando 1000 réplicas. (B) Representación esquemática de los motivos identificados en la región C-terminal menos conservada (TAR) utilizando el software MEME (Bailey *et al.*, 2009; <http://meme-suite.org/>). Los motivos están representados como cajas coloreadas con números clasificatorios en su parte superior. Las proteínas de *P. hybrida* están coloreadas en rojo, mientras que las proteínas NAC con función reportada en senescencia están coloreadas en azul. Dos proteínas de la familia de las actinas de *Arabidopsis* fueron incluídas como controles (grupo externo) y coloreadas en verde. La clasificación de las subfamilias está basada en el sistema propuesto por Shen *et al.* (2009). Un total de 18 grupos (I a XVIII) fueron definidos a partir de integrar los datos filogenéticos con el análisis de motivos presentes en la región C-terminal. Las entradas de *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum* y *Nicotiana tomentosiformis*, fueron obtenidas desde el sitio web del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).





**Figura 14.** Relaciones filogenéticas e identificación de motivos conservados en el extremo C-terminal de proteínas WRKY asociadas a senescencia en diferentes especies. (A) El árbol filogenético fue construido con el programa MEGA5 por el método *Neighbor Joining* a través del alineamiento múltiple del extremo conservado N-terminal de 106 proteínas WRKY. Los valores de *bootstrap* (porcentajes) se encuentran en las ramas y están basados en un análisis de máxima verosimilitud utilizando 1000 réplicas. (B) Representación esquemática de los motivos identificados en la región C-terminal utilizando el software MEME (Bailey *et al.*, 2009; <http://meme-suite.org/>). Los motivos están representados como cajas coloreadas con números clasificatorios en su parte superior. Las proteínas de *P. hybrida* están coloreadas en rojo, mientras que las proteínas WRKY con función reportada en senescencia están coloreadas en azul. Dos proteínas de la familia de las actinas de *Arabidopsis* fueron incluidas como controles (grupo externo) y coloreadas en verde. La clasificación de las subfamilias está basada en el sistema propuesto por Eulgem *et al.* (2000). Un total de 10 grupos (I a X) fueron definidos a partir de integrar los datos filogenéticos y el análisis de motivos presentes en la región C-terminal. Las entradas de *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum* y *Nicotiana tomentosiformis*, fueron obtenidas desde el sitio web del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## Selección de genes candidatos asociados a la senescencia de las familias NAC y WRKY en *P. hybrida*

Para seleccionar genes candidatos que podrían regular la senescencia en petunia, se integraron los análisis de expresión con los grupos funcionales previamente identificados en el análisis filogenético (Tabla 3). Para definir una lista de genes candidatos se definieron dos criterios: 1) que el gen posea un cambio de expresión relativamente temprano y considerable durante la progresión

de la senescencia en los procesos estudiados; y 2) presencia de putativo/s ortólogo/s con función reportada en senescencia en otras especies.

Para ello, inicialmente se separaron los genes según su participación en los distintos tipos de senescencia estudiados (Figs. 11-12) y se clasificó su expresión teniendo en cuenta el momento en que se producen cambios significativos en relación al primer punto de muestreo y las magnitudes parciales y/o globales de dichos cambios en los perfiles. Finalmente, se determinó a que grupo funcional pertenecen teniendo en cuenta su cercanía filogenética con miembros ya reportados como reguladores de la senescencia en otras especies (Tabla 3).

Los genes que aumentaron su expresión en los tres tipos de senescencia estudiados de la familia NAC fueron *PhNAC058*, *PhNAC101*, *PhNAC017*, *PhNAC024*, *PhNAC074*, *PhNAC089*, *PhNAC106*; mientras que los de la familia WRKY fueron *PhWRKY072*, *PhWRKY015*, *PhWRKY028*, *PhWRKY006*, *PhWRKY033* y *PhWRKY063* (Tabla 3). Los miembros de la familia NAC que incluyen a *PhNAC017*, *PhNAC024*, *PhNAC074* y *PhNAC089* parecerían ser los mejores candidatos ya que presentaron expresión calificada como buena y muy buena en los tres tipos de senescencia y además comparten sus grupos filogenéticos con miembros de otras especies que han sido reportados de regular la senescencia (Tabla 3). *PhNAC024* pertenece al grupo funcional III el cual contiene putativos ortólogos que promueven la senescencia foliar en varias especies, incluyendo *Arabidopsis*, arroz, algodón, cebada, trigo, soja y tomate (Fig. 13 y Tabla 3). *PhNAC089* pertenece al grupo II, sus putativos ortólogos aumentan su expresión en hojas de cebada y arroz, y en este último *OsNAC106* regula negativamente la senescencia foliar (Tabla 3). *PhNAC017* pertenece al grupo XI y sus putativos ortólogos promueven la senescencia foliar en *Arabidopsis* y tomate y en los pétalos de la planta ornamental *Ipomoea nil*, siendo el único miembro de la familia NAC reportado hasta el momento que regula la senescencia en estos órganos (Fig. 13 y Tabla 3). Por último, *PhNAC074* perteneciente al grupo VIII, presenta putativos ortólogos que aumentan su expresión durante la senescencia foliar de *Arabidopsis*, pero disminuyen y retrasan la senescencia foliar en trigo (Fig. 13 y Tabla 3). En relación a los miembros de la familia WRKY, los mejores candidatos según su expresión y grupos funcionales corresponden a los genes *PhWRKY033*, *PhWRKY072*, *PhWRKY006* y *PhWRKY063* (Tabla 3). *PhWRKY033* pertenece al grupo funcional X y su putativo ortólogo en trigo fue reportado como promotor de la senescencia foliar en *Arabidopsis*. *PhWRKY072* y *PhWRKY006* pertenecientes al mismo grupo funcional (V), presentan un putativo ortólogo en *Arabidopsis* (*AtWRKY006*) que promueve la senescencia foliar (Fig. 14 y Tabla 3). Por último, *PhWRKY063* pertenece al grupo II que contiene a dos miembros (*AtWRKY054* y *AtWRKY070*) que retrasan la SNH en hojas de *Arabidopsis* (Fig. 14 y Tabla 3).

Los genes *PhNAC058*, *PhNAC101*, *PhNAC106*, *PhWRKY015* y *PhWRKY028* fueron descartados como candidatos fuertes para futuros estudios de función ya que carecieron de una buena

clasificación en sus perfiles de expresión o no presentaron ortólogos con función reportada en sus respectivos grupos funcionales (Figs. 13-14 y Tabla 3).

Por otro lado, otros genes que resultaron interesantes en el análisis fueron aquellos de ambas familias de factores de transcripción que aumentaron su expresión en los procesos de senescencia natural que ocurren tanto en hojas como en pétalos (SNH y SNP; Figs. 13-14). Estos fueron *PhNAC099*, *PhNAC095*, *PhNAC097* y *PhNAC033* para la familia *NAC*; y *PhWRKY075*, *PhWRKY070*, *PhWRKY024*, *PhWRKY053*, *PhWRKY055* y *PhWRKY030* para la familia *WRKY* (Tabla 3). Dentro de la familia *NAC*, el único de los mencionados que presentó un putativo ortólogo con función reportada fue *PhNAC097*, perteneciente al grupo filogenético V donde sus putativos ortólogos aumentan su expresión en hojas de arroz, y aumentan y promueven la SNH en hojas de *Arabidopsis* (Fig. 14 y Tabla 3). *PhNAC095* y *PhNAC033* presentaron expresión regular, mientras que *PhNAC099* mostró buenos perfiles de expresión en ambos tipos de senescencia (Fig. 11).

En cuanto a los genes *WRKY*, *PhWRKY075* resultó ser uno de los más interesantes por los niveles de expresión alcanzados en ambos procesos. *PhWRKY075* pertenece al grupo VIII donde se encuentra su putativo ortólogo de *Arabidopsis*, *AtWRKY075*, que es un regulador positivo de la SNH en esta especie (Fig. 14 y Tabla 3). Por otro lado, *PhWRKY053*, *PhWRKY055* y *PhWRKY030* pertenecen al grupo filogenético III, y sus putativos ortólogos de *Arabidopsis* promueven la senescencia foliar de manera directa (*AtWRKY053*) e indirecta (*AtWRKY030*), respectivamente (Fig. 14 y Tabla 3). *PhWRKY070* mostró perfiles de expresión regulares en ambos procesos, mientras que *PhWRKY024* presentó mejores perfiles de expresión en estadios intermedio-tempranos (Fig. 12). Estos genes pertenecen a los grupos funcionales II y X, respectivamente y no presentan putativos ortólogos con función reportada en senescencia (Fig. 14).

Otro grupo interesante de genes es aquel en el que sus miembros disminuyeron su expresión en los tres tipos de senescencia, constituido por tres genes de la familia *NAC* (*PhNAC004*, *PhNAC052* y *PhNAC053*) (Tabla 3). *PhNAC004* es considerado el mejor candidato debido a que su cambio de expresión durante la senescencia fue muy bueno y es el único que presenta putativos ortólogos con función reportada en senescencia. Sin embargo, la expresión de *PhNAC004* es opuesta a la expresión creciente observada en *Arabidopsis* (*AtJUB1*) y en soja (*GmNAC81*) conforme avanza la senescencia foliar (Tabla 3).

Por último, los restantes miembros de las familias *NAC* y *WRKY* pertenecen al grupo de genes que solo presentaron expresión diferencial en la SNH, *PhNAC085*, *PhNAC051*, *PhNAC082*, *PhNAC094*, *PhNAC023*, *PhNAC096*, *PhNAC105*, *PhWRKY069* y *PhWRKY054* (Tabla 3). *PhWRKY054* fue el único miembro del grupo que mostró un buen perfil de expresión en la SNH y pertenece al grupo funcional II junto con *AtWRKY054* y *AtWRKY070*, mientras que el resto presentó una expresión

regular (Fig. 12 y 14), por lo que no fueron tenidos en cuenta para futuros estudios de función en senescencia.

El análisis descripto nos permitió seleccionar candidatos fuertes de las familias NAC y WRKY en *P. hybrida* que podrían regular la senescencia foliar y de los pétalos debido a la magnitud y momentos tempranos e intermedios en que los cambios de expresión se producen en los distintos tipos de senescencia. Además, se suma la presencia en sus grupos funcionales de putativos ortólogos que regulan la senescencia en otras especies, compartiendo motivos proteicos en su región C-terminal (Tabla 3).

<i>Petunia hybrida</i>				Putativos ortólogos			
Categoría de expresión	Gen	Grupo Filogenético	Expresión general	Sinónimo	Expresión en senescencia	Función en senescencia	Referencias
Aumenta en los tres procesos	<i>PhNAC024</i>	III	muy bueno	<i>AtNAP</i> ; <i>OsNAP</i> ; <i>GhNAP</i> ; <i>SINAP2</i> ; <i>HvNAC005</i> ; <i>GmNAC1</i> ; <i>HaNAC003</i> (*); <i>VvNAC1</i> (*), <i>TiNAM-B1</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis, arroz, algodón, cebada, soja, tomate, girasol, vid y trigo	Promueve la SNH en Arabidopsis, arroz, algodón, cebada, trigo, soja y tomate.	Guo y Gan, 2006; Zhou <i>et al.</i> , 2013; Uauy <i>et al.</i> , 2006, Ma <i>et al.</i> , 2018, Fan <i>et al.</i> , 2015; Christiansen <i>et al.</i> , 2016; Pinheiro <i>et al.</i> , 2009; Moschen <i>et al.</i> , 2014; Hénanff <i>et al.</i> , 2013
	<i>PhNAC058</i>	X	regular	<i>AtNAC046</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis	Promueve la SNH en Arabidopsis	Oda-Yamamizo <i>et al.</i> , 2016
	<i>PhNAC106</i>	I	bueno	-	-	-	-
	<i>PhNAC089</i>	II	bueno	<i>OsNAC106</i> ; <i>HvNAC026</i> (*)	Aumenta en hojas de arroz y cebada	Retrasa la SNH en arroz	Sakuraba <i>et al.</i> , 2015; Christiansen y Gregersen, 2014
	<i>PhNAC017</i>	XI	muy bueno	<i>AtORE1</i> ; <i>AtORS1</i> ; <i>GhNAC12</i> ; <i>SIORE1S02</i> ; <i>InEPHEMERAL1</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis, algodón, tomate, y en pétalos de <i>Ipomoea nil</i>	Promueve la SNH en Arabidopsis y tomate y la SNP en <i>Ipomoea nil</i>	Kim <i>et al.</i> , 2009; Balazadeh <i>et al.</i> , 2011; Zhao <i>et al.</i> , 2015; Shibuya <i>et al.</i> , 2014; Lira <i>et al.</i> , 2017
	<i>PhNAC074</i>	VIII	bueno	<i>ANAC021</i> (*); <i>TaNAC-S</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis y disminuye en trigo	Retrasa la SNH en trigo	Zhao <i>et al.</i> , 2015
	<i>PhNAC101</i>	IV	bueno	-	-	-	-
	<i>PhWRKY033</i>	X	muy bueno	<i>TaWRKY007</i>	Aumenta en hojas de trigo	Promueve SNH natural en Arabidopsis	Zhang <i>et al.</i> , 2016
	<i>PhWRKY072</i>	V	muy bueno	<i>AtWRKY006</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis	Promueve SNH en Arabidopsis	Robatzek y Somssich, 2002
	<i>PhWRKY006</i>	V	bueno	<i>AtWRKY006</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis	Promueve SNH en Arabidopsis	Robatzek y Somssich, 2002
	<i>PhWRKY063</i>	II	bueno	<i>AtWRKY054</i> ; <i>AtWRKY070</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis	Retrasa SNH en Arabidopsis	Besseau <i>et al.</i> , 2012
	<i>PhWRKY015</i>	IV	regular	-	-	-	-
	<i>PhWRKY028</i>	IX	muy bueno	-	-	-	-
Aumenta en SNH	<i>PhNAC085</i>	IX	bueno	-	-	-	-
	<i>PhNAC051</i>	IX	bueno	-	-	-	-
	<i>PhNAC082</i>	VII	bueno	-	-	-	-
	<i>PhNAC094</i>	XV	regular	-	-	-	-
	<i>PhNAC023</i>	XIII	regular	<i>AtNLT9</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis	Promueve SNH en Arabidopsis	Yoon <i>et al.</i> , 2008
	<i>PhNAC096</i>	XVIII	regular	<i>AtNLT4</i> ; <i>GhNAC13</i> (*)	Aumenta en hojas de Arabidopsis y disminuye en hojas de algodón	Promueve SNH en Arabidopsis	Lee <i>et al.</i> , 2012, 2014; Shah <i>et al.</i> , 2013
	<i>PhNAC105</i>	XVI	regular	<i>AtNAC016</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis	Promueve SNH en Arabidopsis	Kim <i>et al.</i> , 2013
	<i>PhWRKY069</i>	I	regular	-	-	-	-
<i>PhWRKY054</i>	II	muy bueno	<i>AtWRKY054</i> ; <i>AtWRKY070</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis	Retrasa SNH en Arabidopsis	Besseau <i>et al.</i> , 2012	
Aumenta en SNH y SNP	<i>PhNAC099</i>	XIV	bueno	-	-	-	-
	<i>PhNAC095</i>	XVII	regular	-	-	-	-
	<i>PhNAC097</i>	V	regular	<i>AtATAF1</i> ; <i>OsNAC5</i> (*)	Aumenta en hojas de Arabidopsis y arroz	Promueve SNH en Arabidopsis	Garapati <i>et al.</i> , 2015; Sperotto <i>et al.</i> , 2009
	<i>PhNAC033</i>	IV	regular	-	-	-	-
	<i>PhWRKY075</i>	VIII	muy bueno	<i>AtWRKY075</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis	Promueve SNH en Arabidopsis	Li <i>et al.</i> , 2013
	<i>PhWRKY070</i>	II	regular	-	-	-	-
	<i>PhWRKY024</i>	X	bueno	-	-	-	-
	<i>PhWRKY053</i>	III	regular	<i>AtWRKY053</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis	Promueve SNH en Arabidopsis	Miao <i>et al.</i> , 2004
	<i>PhWRKY055</i>	III	regular	<i>AtWRKY053</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis	Promueve SNH en Arabidopsis	Miao <i>et al.</i> , 2004
<i>PhWRKY030</i>	III	muy bueno	<i>AtWRKY030</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis	Promueve indirectamente SNH en Arabidopsis	Besseau <i>et al.</i> , 2012	
Disminuye en los tres procesos	<i>PhNAC052</i>	VII	muy bueno	-	-	-	-
	<i>PhNAC004</i>	VI	muy bueno	<i>AtJUB1</i> ; <i>GmNAC81</i>	Aumenta en hojas de Arabidopsis y soja	Retrasa la SNH en Arabidopsis; promueve SNH en soja	Wu <i>et al.</i> , 2012; Pimenta <i>et al.</i> , 2016
	<i>PhNAC053</i>	VII	bueno	-	-	-	-

**Tabla 3.** Resumen de los genes *NAC* y *WRKY* identificados en *P. hybrida* en base a su expresión en senescencia y análisis filogenéticos. Los genes se dividieron en cuatro categorías según su participación en los tres tipos de senescencia estudiados. La categoría de expresión general de los genes se

estableció en base al momento en que se produce el cambio de expresión y de la magnitud del mismo. Se muestran los grupos funcionales correspondientes a cada gen, con información de expresión y función en senescencia de sus putativos ortólogos en otras especies. Putativos ortólogos no incluidos en las figuras 13 y 14 fueron agregados a la tabla. Los asteriscos (\*) indican genes que hasta el momento solo poseen cambios de expresión asociados a la senescencia.

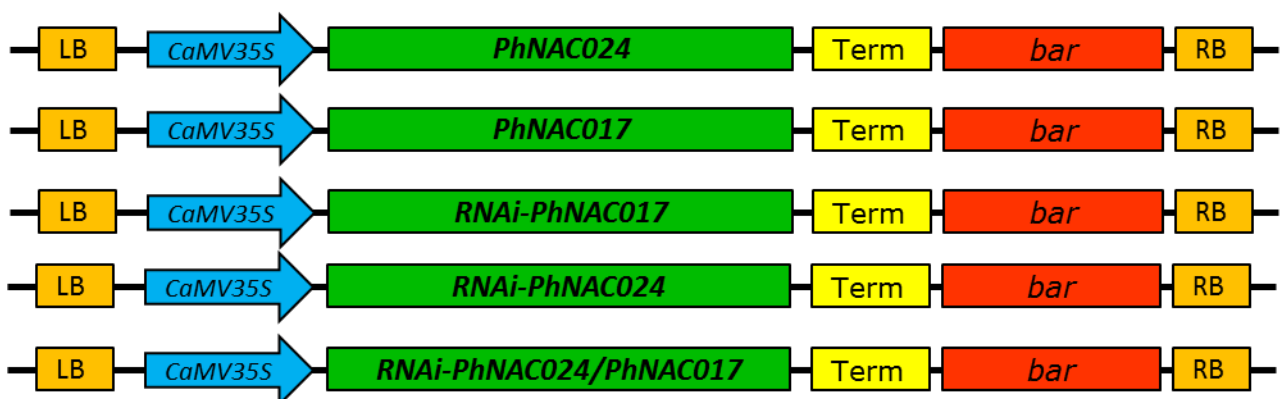
Si bien muchos de los genes mencionados anteriormente podrían ser utilizados para analizar su función en distintos tipos de senescencia, por una cuestión de tiempos y costos, se decidió continuar con los análisis funcionales de *PhNAC024* y *PhNAC017*, por ser considerados muy buenos candidatos a regular la senescencia en *P. hybrida*.

## CAPÍTULO 4

### Análisis funcional de dos genes candidatos de la familia NAC, *PhNAC024* y *PhNAC017*, a través de la generación de plantas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento génico

#### Generación de plantas transgénicas

Con el objetivo de determinar la participación de los genes *PhNAC024* y *PhNAC017* en la regulación de la senescencia foliar y floral en *P. hybrida*, se generaron líneas transgénicas independientes de sobre-expresión y silenciamiento génico por ARN interferencia (ARNi). Para ello, se transformaron plantas de *P. hybrida* cv. 'Mitchell Diploid' con *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo el vector de expresión constitutivo en plantas *pEarleyGate 100* del sistema Gateway con distintas variantes capaces de sobre-expresar o silenciar los genes mencionados (Fig. 15).



**Figura 15.** Esquema de las construcciones utilizadas para la generación de líneas sobre-expresantes y de silenciamiento de los genes candidatos *PhNAC024* y *PhNAC017*. Se generó además la construcción *RNAi-PhNAC024/PhNAC017* para disminuir la expresión de ambos genes candidatos de forma simultánea. Se muestra la porción del vector *pEarleyGate 100* comprendida entre el borde izquierdo (LB) y el borde derecho (RB) del T-DNA. (CaMV 35S) promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower Mosaic Virus 35S*). (Term) terminador transcripcional. (bar) gen que codifica para la enzima *barnase* (*bar*) que confiere resistencia a glufosinato de amonio en plantas.



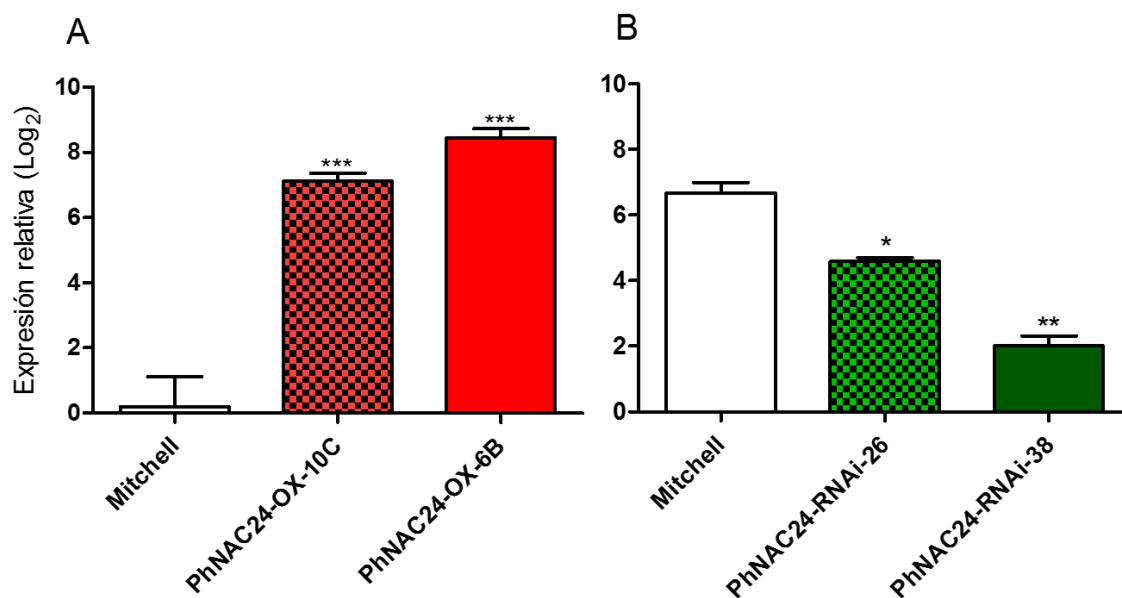
Distintas líneas transgénicas de cada construcción fueron regeneradas *in vitro* en presencia del agente selectivo glufosinato de amonio (Liberty®, Bayer) (ver Materiales y Métodos). Las líneas resistentes al agente selectivo fueron verificadas de contener las respectivas construcciones insertas en su genoma mediante reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos complementarios al promotor viral 35S y a una región interna del vector (datos no mostrados). Aquellas líneas con resultado positivo para la PCR pero que mostraron un crecimiento anómalo durante el cultivo *in vitro* fueron descartadas. Dos líneas independientes de cada genotipo fueron seleccionadas, propagadas vegetativamente *in vitro* y aclimatadas en cámaras de cultivo para posteriores estudios de función en senescencia. La línea *RNAi-PhNAC024/PhNAC017* fue discontinuada de los análisis ya que solo se pudo obtener una única línea independiente luego de varios intentos de transformación.

### **Evaluación de plantas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento génico de *PhNAC024***

Para evaluar la abundancia de transcritos de *PhNAC024* en las líneas de sobre-expresión y de silenciamiento, se realizó un ensayo preliminar con un número reducido de plantas. Para cada genotipo se cosecharon en nitrógeno líquido muestras de la hoja 7 del tallo principal en dos momentos diferentes del desarrollo foliar en relación a la máxima expansión de plantas cultivadas en cámara de crecimiento. Se realizaron extracciones de ARN seguidas de retro-transcripción y posteriormente reacciones de qPCR utilizando oligonucleótidos específicos para *PhNAC024* y el gen de referencia *PhEF1a* (ver Materiales y Métodos). Para las líneas de silenciamiento, los oligonucleótidos utilizados fueron específicos para una región que no fue incluida en el fragmento utilizado para silenciar dicho gen. Plantas no transformadas regeneradas *in vitro* fueron utilizadas como controles en los experimentos.

Como se describió en el Capítulo 3, el gen *PhNAC024* mostró niveles de expresión prácticamente indetectables en etapas tempranas del desarrollo foliar (Fig. 8B), con lo cual, utilizamos ese momento de desarrollo foliar para evaluar la abundancia de transcritos en las líneas de sobre-expresión (Fig. 16A). La abundancia de transcritos de *PhNAC024* en las dos líneas sobre-expresantes *PhNAC024-OX-6B* y *PhNAC024-OX-10C* fue muy alta en comparación con la línea control (Fig. 16A). Por otro lado, para la evaluación de transcritos de las líneas de silenciamiento, se utilizaron hojas con síntomas visibles de amarillamiento, momento en que previamente se observaron mayores niveles de *PhNAC024* en plantas de *P. hybrida* (Fig. 8B). Los niveles de expresión de *PhNAC024* en las dos líneas de silenciamiento independientes seleccionadas, *PhNAC024-RNAi-26* y *PhNAC024-RNAi-38*, fueron menores respecto de la línea control, llegando

incluso a niveles que corresponden a la tercera parte de los valores normales (línea *PhNAC024-RNAi-38*) (Fig. 16B). Los resultados indican que las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento de *PhNAC024* son óptimas para estudiar la función en senescencia de este gen candidato.



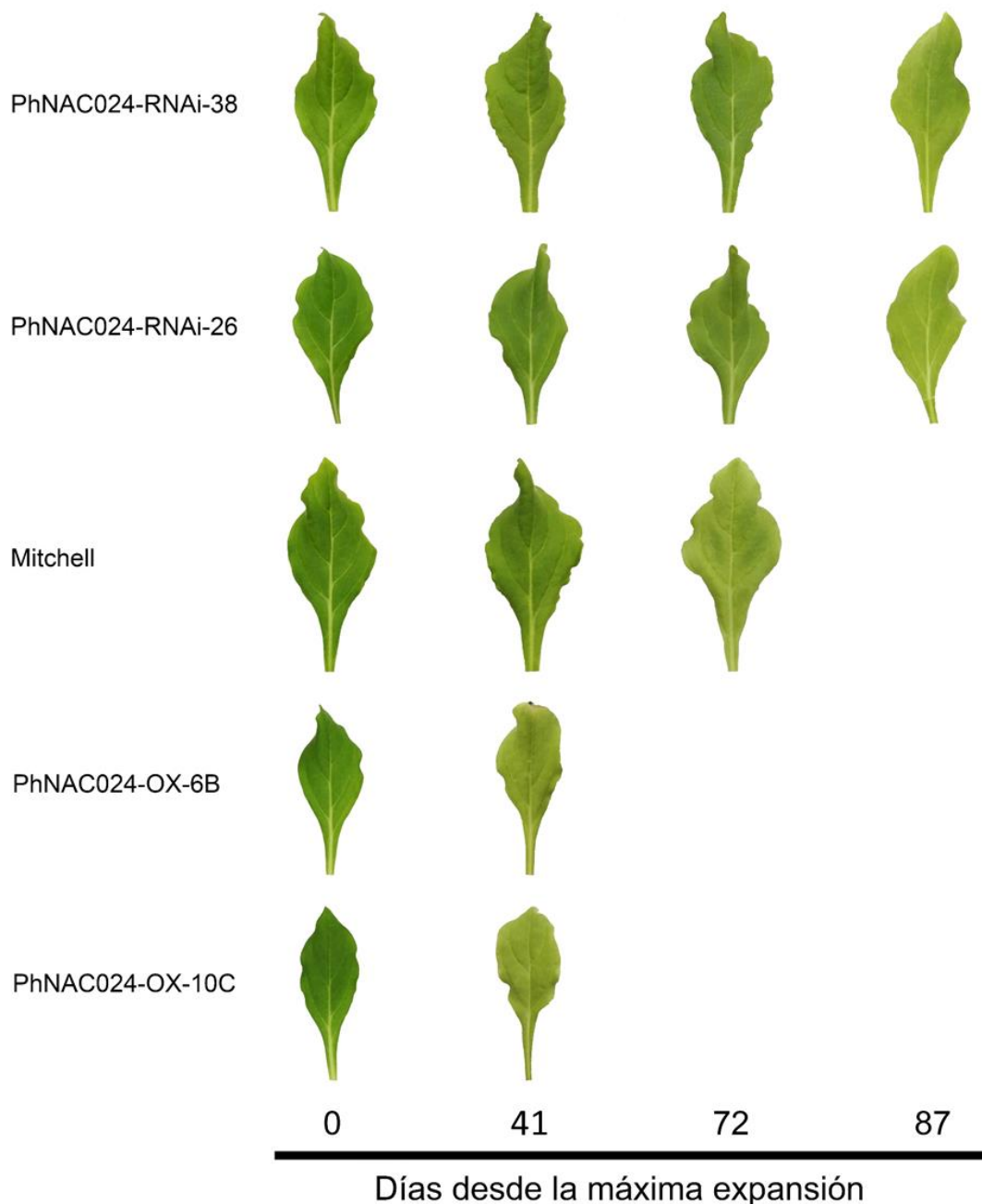
**Figura 16.** Análisis de expresión en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento de *PhNAC024*. (A) Expresión relativa de *PhNAC024* en las líneas sobre-expresantes en relación a la línea control (Mitchell) en una hoja joven completamente expandida (madura). (B) Expresión relativa de *PhNAC024* en las líneas de silenciamiento y en la línea control en hojas con síntomas visibles de amarillamiento (síntomas principalmente observados en la línea control). Los valores de expresión se muestran en relación al valor de la hoja joven totalmente expandida de la línea control mostrada en (A). Los niveles de expresión (escala Log<sub>2</sub>) fueron normalizados a la expresión del gen de referencia *PhEF1a*. Los asteriscos indican diferencias significativas utilizando ANOVA de un factor seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). El ANOVA es independiente para cada panel. Las barras corresponden al error standard.

### Estudios fisiológicos y moleculares asociados al avance de la senescencia foliar en líneas de sobre-expresión y silenciamiento de *PhNAC024*

Con el objetivo de caracterizar el rol de *PhNAC024* en la senescencia foliar de *P. hybrida*, se analizó la SNH en las líneas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento de *PhNAC024* en comparación con plantas control (Mitchell). Las plantas fueron cultivadas en cámara de crecimiento y para cada genotipo se marcó la hoja 7 del tallo principal. En distintos momentos se cosecharon muestras de dicha hoja desde el día en que las mismas alcanzaron su máxima expansión (día 0) hasta los primeros síntomas visibles de amarillamiento para cada uno de los genotipos analizados. De esta manera, los muestreos de la SNH se realizaron los días 0, 14, 30, 41, 72 y 87 en relación a la máxima expansión foliar (Fig. 17).

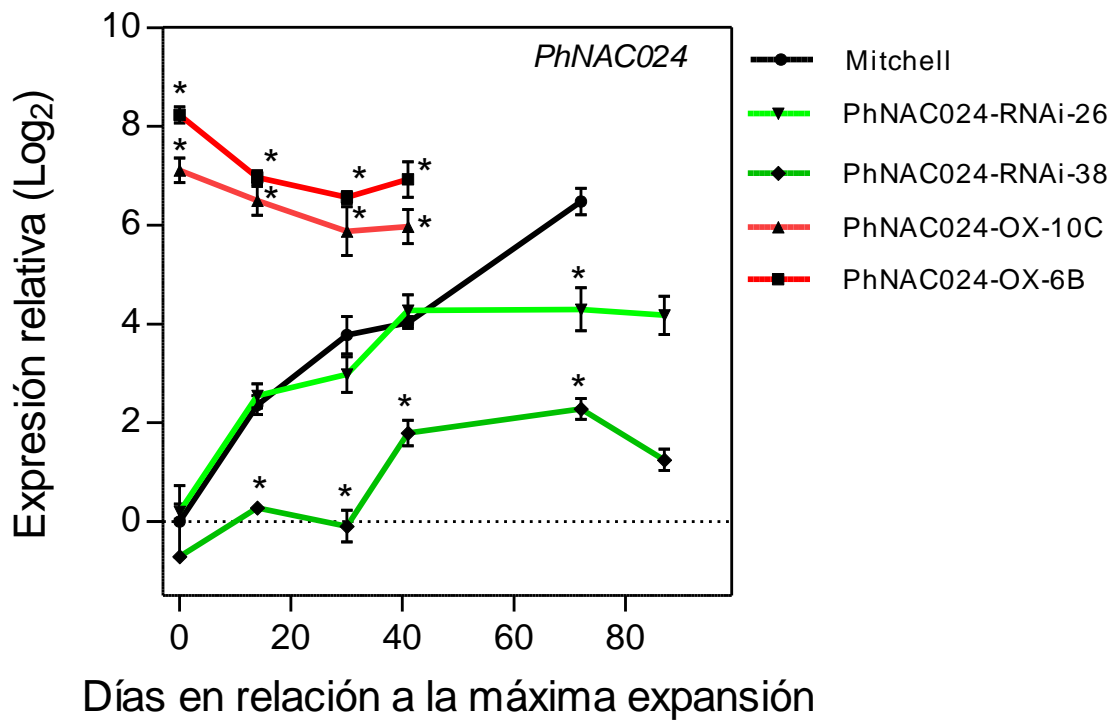
Las hojas de ambas líneas sobre-expresantes de *PhNAC024* presentaron longevidad disminuida (41 días en promedio) en comparación con la línea control (72 días). Mientras que en las líneas de silenciamiento de *PhNAC024* la longevidad de las hojas fue superior a la de la línea control (87

días). En la última cosecha de las líneas de silenciamiento, el amarillamiento en las hojas de la línea RNAi-26 fue más evidente que en la línea RNAi-38 (Fig. 17), lo cual se correlacionó con los niveles de silenciamiento observados en cada una de ellas (Fig. 16B). Los resultados indican que *PhNAC024* estaría regulando la senescencia foliar en petunia y que esta regulación sería dependiente de los niveles de abundancia de *PhNAC024*.



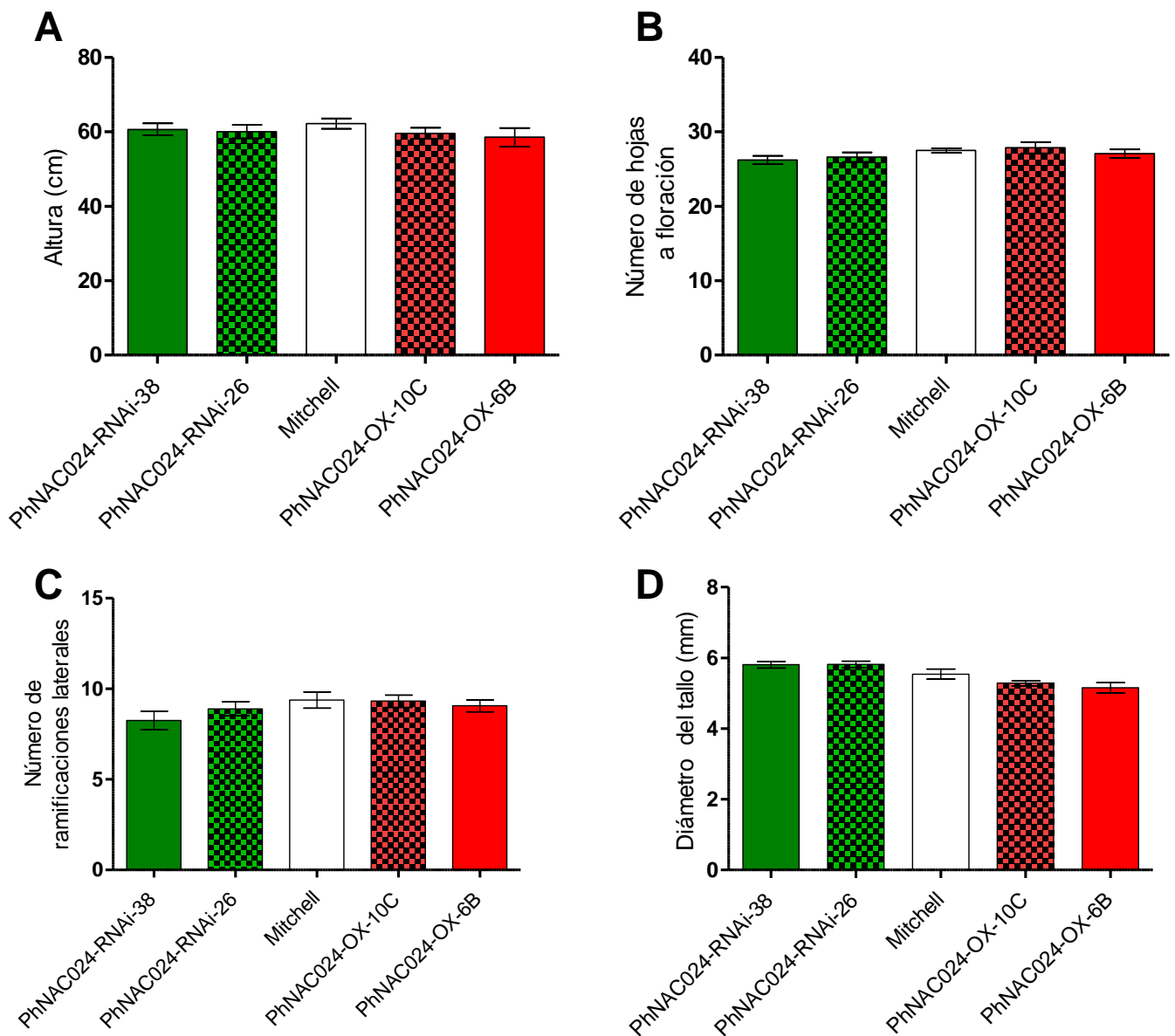
**Figura 17.** Fenotipo de las hojas de la posición 7 del tallo principal durante el avance de la senescencia natural foliar (SNH) en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico por ARNi de *PhNAC024*. Se muestran las hojas cosechadas en los días 0, 41, 72 y 87 en relación a su máxima expansión foliar. En la imagen se muestran hojas representativas de cada genotipo en los distintos puntos de muestreo.

Para confirmar los resultados de expresión del transgén previamente observados (Fig. 16), se evaluó la abundancia de *PhNAC024* por qPCR en las líneas transgénicas en los puntos de muestreo descritos en la Fig. 17. En ambas líneas sobre-expresantes la expresión de *PhNAC024* fue muy alta desde las etapas iniciales y se mantuvo constante a lo largo de la SNH (desde el día 0 al día 41 en relación a la máxima expansión foliar), con valores que difirieron de la línea control en todos los puntos de muestreo (Fig. 18). Por otro lado, las líneas de silenciamiento de *PhNAC024* mostraron diferencias entre ellas. Mientras que la línea RNAi-38 mantuvo niveles de expresión mucho menores y significativos en los distintos puntos de muestreo en comparación con la línea control (con excepción del primer punto), la línea RNAi-26 se mantuvo con niveles similares a la línea control desde el día 0 al día 41, aunque significativamente menores en las últimas cosechas (desde el día 41 al 72) (Fig. 18). Los resultados confirman las diferencias fenotípicas en las hojas observadas en el análisis de SNH entre ambas líneas de silenciamiento (Fig. 17). La longevidad de las hojas en cada línea independiente se correlaciona con los niveles de transcritos de *PhNAC024*, siendo más baja en las líneas sobre-expresantes y más alta en las líneas de silenciamiento en relación al genotipo control. Además, la diferencia existente en los niveles de amarillamiento de las líneas de silenciamiento en el último punto de muestreo (Fig. 17) podría explicarse por la falta de disminución de *PhNAC024* en las etapas más iniciales de la SNH en la línea RNAi-26, como se mencionó previamente (Fig. 18). Es interesante notar que la disminución de *PhNAC024* recién en las etapas tardías de la SNH en la línea RNAi-26 parecería ser suficiente como para prolongar la longevidad de las hojas en comparación con la línea control (Figs. 17-18).



**Figura 18.** Análisis de expresión de *PhNAC024* en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico durante la senescencia natural foliar (SNH). Los niveles de expresión de cada una de las líneas se muestran como la relación (Log2) entre cada punto de muestreo y el primer punto de muestreo de la línea Mitchell control y normalizados a la expresión del gen de referencia *PhEF1a*. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey. Para una mejor visualización, las letras del análisis de Tukey no son mostradas. En su lugar con asteriscos (\*) se indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada línea transgénica y la línea Mitchell control en cada punto de muestreo. Las barras corresponden al error standard.

Una vez confirmada la expresión de *PhNAC024* en las líneas transgénicas, se decidió estudiar un posible rol regulatorio de *PhNAC024* en diferentes aspectos de la morfología de las plantas como la altura, el número de ramas laterales, el diámetro del tallo principal, así como también el tiempo a floración (Fig. 19). Este último se evaluó a través de la cuantificación del número de hojas producidas desde la base del tallo principal hasta el cambio a la fase reproductiva. Si bien se observan algunas tendencias, no se produjeron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados (Fig. 19).



**Figura 19.** Características morfológicas y tiempo a floración en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC024*. (A) Altura total de las plantas. (B) Tiempo a floración evaluado en base al número de hojas del tallo principal hasta la antesis. (C) Número de ramas laterales del tallo principal. (D) Diámetro del tallo principal. Las mediciones se realizaron sobre plantas adultas al momento en que presentaron sus primeras flores. Se realizó análisis de la varianza (ANOVA) seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Para dilucidar si las alteraciones en la longevidad de las hojas entre las líneas transgénicas y la línea control se deben a una efectiva alteración de la SNH (Fig. 17), se cuantificaron distintos marcadores fisiológicos y moleculares asociados con el avance de este proceso en los puntos de muestreo descritos anteriormente (Fig. 20). Los niveles de clorofila tendieron a disminuir rápidamente en las líneas sobre-expresantes al compararlas con la línea control, aunque recién se observaron diferencias significativas en el día 30 para la línea OX-6B y en el día 41 para ambas

líneas, totalizando una disminución de aproximadamente 25% respecto de la línea control en el día 41 (Fig. 20A). Las líneas de silenciamiento se comportaron de manera similar a la línea control hasta el día 41, aunque posteriormente en el día 76 los niveles de clorofila llegaron a valores mínimos en la línea control (similares a los de las líneas sobre-expresantes en el día 41) mientras que las líneas de silenciamiento mantuvieron sus niveles de clorofila más altos, siendo esta diferencia solo significativa para la línea RNAi-38 (Fig. 20A). A partir del día 76 y hasta el día 87 el contenido de clorofila de las líneas de silenciamiento disminuyó al mínimo, aunque no llegaron a los valores de la línea control ni de las líneas sobre-expresantes (Fig. 20A).

El contenido de proteínas solubles disminuyó en todas las líneas conforme avanzaba la SNH, aunque la caída en las líneas sobre-expresantes fue significativamente más pronunciada en etapas muy tempranas del proceso, a los 14 días (Fig. 20B). Por otro lado, las líneas de silenciamiento mostraron una caída en las proteínas muy parecida a la de la línea control en las etapas iniciales, aunque se observa una marcada tendencia a permanecer con valores más elevados en las últimas etapas de la SNH (Fig. 20B). Nuevamente la línea RNAi-26 presentó valores intermedios, entre la línea control y la línea RNAi-38, aunque estos no resultaron significativos (Fig. 20B).

Además de los marcadores fisiológicos, se cuantificó la expresión de putativos ortólogos de genes reportados como marcadores del avance de este proceso en las hojas de Arabidopsis y tomate. Dentro de los genes se incluyó a *CAB2* y *SAG12* (previamente evaluados en *P. hybrida*, Fig. 1), *SGR1* (*SENESCENCE-INDUCIBLE CHLOROPLAST STAY-GREEN PROTEIN 1*) y *PAO* (*PHEIDE A OXIGENASE*) que están asociados a la degradación de los cloroplastos, *SAG113* (*SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 113*) una fosfatasa reportada como *SAG* asociada a la vía de señalización del ABA y *BFN1* (*BIFUNCTIONAL NUCLEASE-1*) una nucleasa tipo I que participa en la degradación de los ácidos nucleicos (Zhang y Gang, 2012; Ma *et al.*, 2018; Matallana-Ramírez *et al.*, 2013) (Fig. 20C-H).

Los perfiles de expresión de *PhCAB2* se comportaron de forma similar en todas las líneas, disminuyendo en las etapas tempranas y posteriormente manteniendo sus niveles más o menos estables. Si bien no se produjeron diferencias significativas entre las líneas transgénicas y la línea control, en el día 30 y 41 las líneas sobre-expresantes de *PhNAC024* mostraron una tendencia a presentar niveles inferiores, lo cual se correlacionó con su clorosis prematura (Fig. 20C). Los niveles de expresión en las líneas de silenciamiento mostraron una tendencia a ser iguales o mayores respecto de los de la línea control (Fig. 20C).

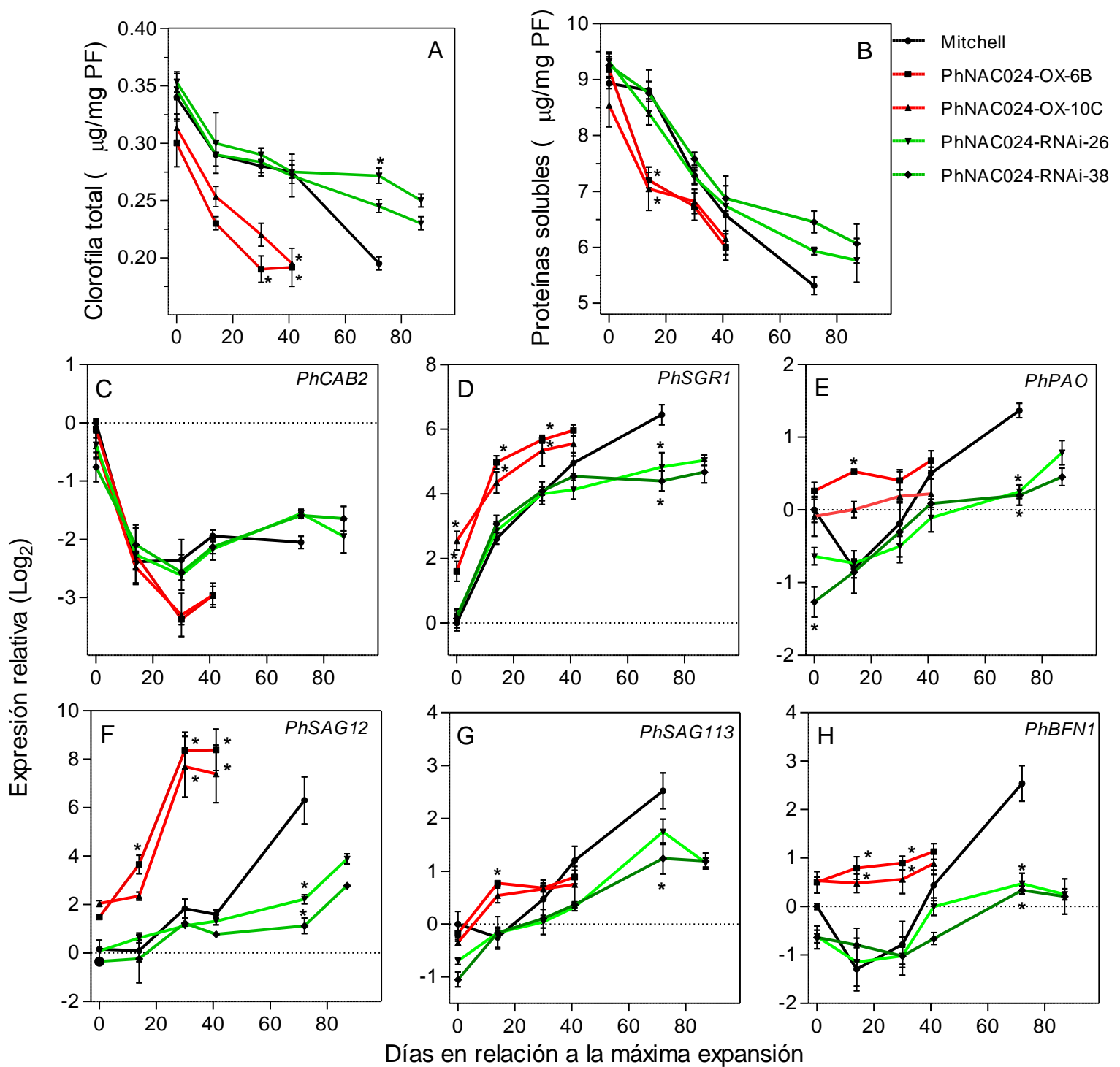
Por otro lado, la expresión de los genes asociados a la degradación de los cloroplastos, *PhSGR1* y *PhPAO*, aumentó conforme avanza la senescencia en los distintos genotipos. Las líneas sobre-expresantes mostraron niveles mayores del gen *PhSGR1* desde etapas muy tempranas manteniendo las diferencias con la línea control a lo largo de todas las cosechas (Fig. 20D y E). En

el caso del gen *PhPAO*, la línea OX-6B mostró diferencias significativas en el día 14. Cabe destacar que en ambas líneas sobre-expresantes los perfiles de *PhPAO* tendieron a estar por encima del perfil de expresión de la línea control. Para ambos genes, las líneas de silenciamiento mantuvieron niveles similares a los de la línea control en las etapas iniciales, aunque sus perfiles de expresión se mantuvieron por debajo del perfil de la línea control en las etapas tardías (días 72 y 87) (Fig. 20D-E).

Al analizar los genes asociados a la senescencia (SAG), los niveles de la cisteín proteasa *PhSAG12* para las líneas sobre-expresantes se mostraron elevados desde etapas muy tempranas del proceso, e incluso desde el primer punto de muestreo, mientras que para la línea control el aumento de expresión de este gen se evidenció en etapas más tardías (Fig. 20F), como se observó previamente en plantas control de *P. hybrida* (Fig. 1D). El aumento en los niveles de *PhSAG12* en las líneas de silenciamiento fue muy tardío y los niveles estuvieron muy por debajo en relación a la línea control (Fig. 20F). Por otro lado, la expresión de la fosfatasa asociada a la vía de señalización del ABA, *PhSAG113*, fue mayor en la línea OX-6B en el día 14, aunque los perfiles de ambas líneas sobre-expresantes se encontraron con una tendencia a estar por encima del perfil de la línea control. La expresión de *PhSAG113* en las líneas de silenciamiento no aumentó tan marcadamente a como lo hizo la línea control en las etapas tardías del proceso, aunque solo se observaron diferencias significativas para la línea RNAi-38 en el día 72 (Fig. 20G). Por otro lado, los perfiles de expresión de *PhBFN1* fueron muy similares a los mostrados por *PhSAG12*, con altos niveles de expresión desde etapas tempranas en ambas líneas sobre-expresantes y niveles disminuidos en las líneas de silenciamiento desde el día 40 en comparación con la línea control (Fig. 20H).

Los cambios observados en las líneas transgénicas en comparación con la línea control en el contenido de clorofila total, proteínas solubles y síntomas visuales en las hojas (Figura 17), así como la expresión de los genes asociados a la senescencia descritos, indican que *PhNAC024* actúa como un regulador positivo de la senescencia foliar natural en *P. hybrida*.

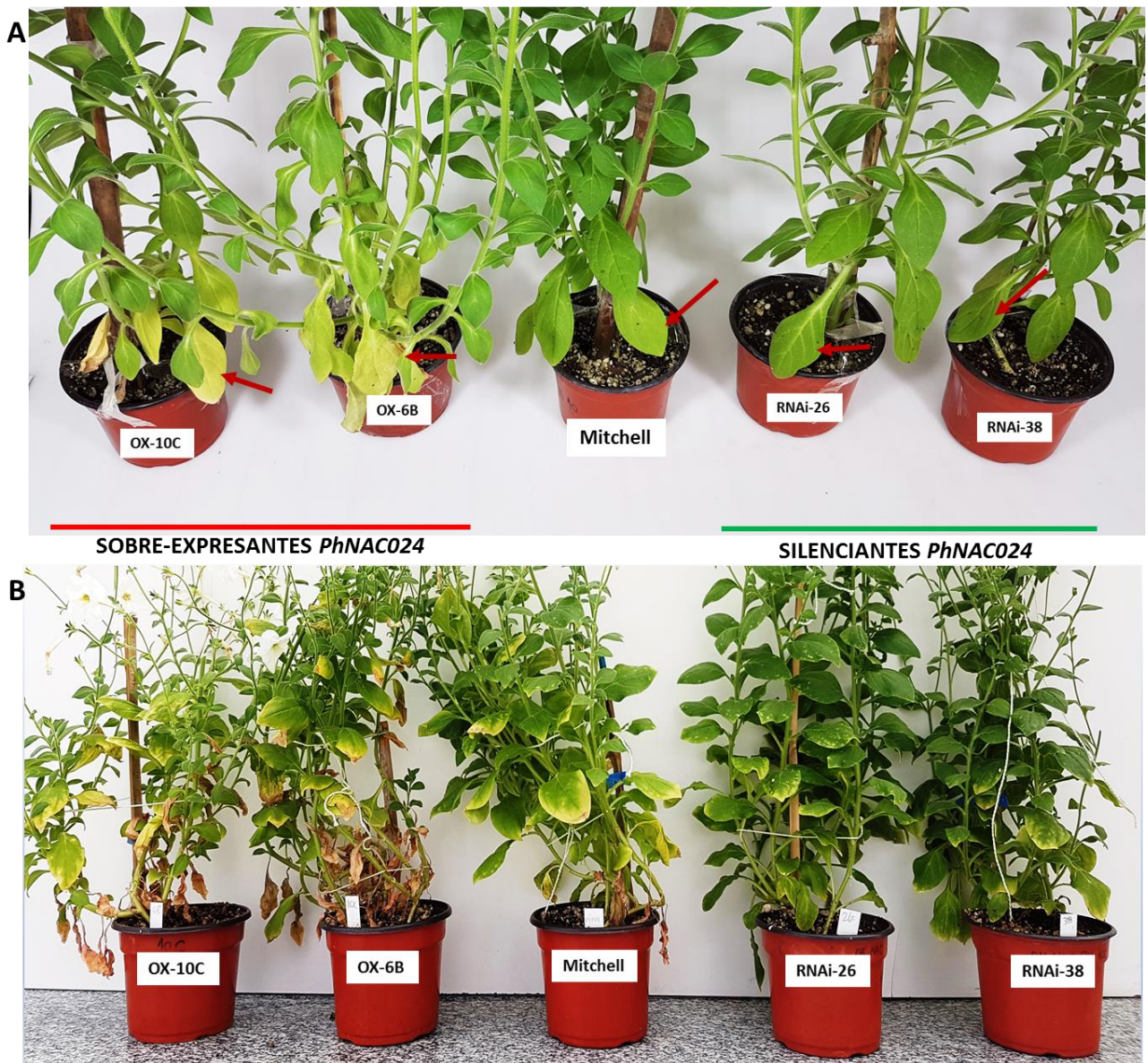




**Figura 20.** Análisis de parámetros fisiológicos y moleculares asociados al avance de la senescencia natural foliar (SNH) en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC024*. (A) Contenido de clorofila total. (B) Contenido de proteínas solubles. (C-H) Expresión relativa de putativos ortólogos de genes asociados a la senescencia en *Arabidopsis* y tomate. Los niveles de expresión de cada una de las líneas se muestran como la relación (Log<sub>2</sub>) entre cada punto de muestreo y el primer punto de muestreo de la línea Mitchell control y normalizados al gen de referencia *PhEF1a*. Los perfiles de expresión de cada gen fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey. Para una mejor visualización, las letras del análisis de Tukey no son mostradas. En su lugar con asteriscos (\*) se indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada línea transgénica y la línea Mitchell control en cada punto de muestreo. Las barras corresponden al error standard.

A los 60 días del trasplante aproximadamente, las plantas de los diferentes genotipos mostraron claras diferencias asociadas a la senescencia de las hojas (Fig. 21A). Las líneas sobre-expresantes se destacaron por un pronunciado amarillamiento y senescencia acelerada de las hojas basales en comparación con la línea control (Fig. 21A). Asimismo, las líneas de silenciamiento de *PhNAC024* mostraron hojas basales más verdes en relación a hojas equivalentes de plantas Mitchell control (hoja número 3 contada desde la base).

Una vez finalizados los muestreos de las hojas del experimento de SNH, las plantas de los distintos genotipos fueron podadas (reducción de la longitud del tallo principal en aproximadamente 60%) y dejadas en la cámara de cultivo para su rebrote y de esa forma evaluar su comportamiento en el largo plazo. Aproximadamente a los 90 días del trasplante, las líneas sobre-expresantes mostraron de manera muy clara aceleración de la senescencia en sus hojas basales (observándose principalmente hojas marchitas) en comparación con la línea control. Por otro lado, se observó un claro retraso de la senescencia en las hojas de ambas líneas de silenciamiento (Fig. 21B). En conjunto, estas evidencias refuerzan los resultados previamente descritos (Figs.17-18 y 20).



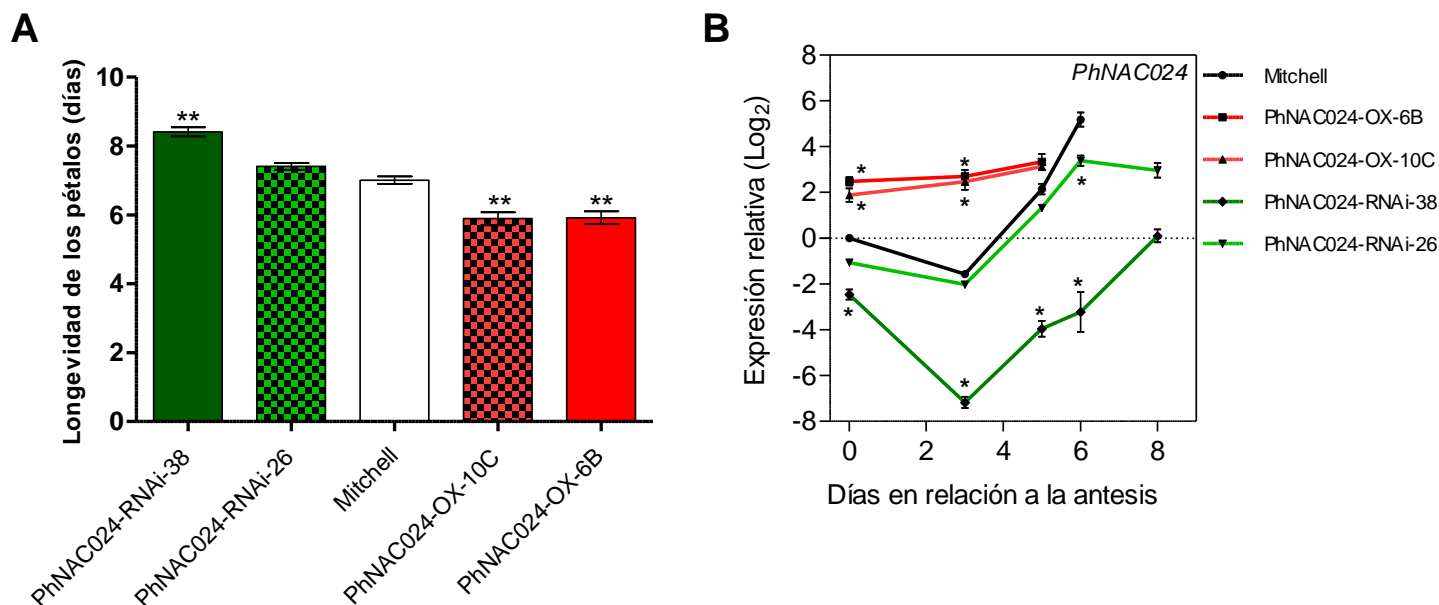
**Figura 21.** Fenotipo de las plantas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC024*. (A) Foto representativa de plantas de los distintos genotipos a los 60 días del trasplante. Las flechas rojas indican la hoja 3 de cada planta. (B) Foto representativa de plantas de los distintos genotipos a los 90 días del trasplante luego de ser podadas al finalizar el ensayo de SNH. En cada imagen se muestra una planta representativa de cada genotipo.

### Estudios fisiológicos y moleculares asociados al avance de la senescencia en los pétalos de las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de *PhNAC024*

Una vez caracterizada la SNH, se decidió evaluar un posible rol de *PhNAC024* en la regulación de la senescencia en los pétalos (SNP y SIP). Ensayos preliminares de flores polinizadas manualmente no mostraron diferencias en el tiempo de senescencia de los pétalos para ninguna de las distintas líneas transgénicas al compararlas con la línea control, por lo que consideramos que *PhNAC024* no participaría en la regulación de este tipo de senescencia (datos no mostrados). Por otro lado, se estudió la longevidad de los pétalos en flores sin polinizar (SNP) en las líneas sobre-

expresantes y de silenciamiento en comparación con la línea control (Fig. 22A). Las líneas de sobre-expresión de *PhNAC024* mostraron longevidad reducida en sus pétalos, entre 5 y 6 días en promedio en comparación con los 7 días de las plantas control. Por otro lado, las líneas de silenciamiento mostraron una longevidad mayor en comparación con la línea control (Fig.22A), aunque solo la línea *PhNAC024-RNAi-38* mostró diferencias significativas con una longevidad de entre 8 y 9 días en promedio.

Para determinar si las diferencias en la longevidad podrían deberse a cambios en la expresión de *PhNAC024* entre los distintos genotipos, se evaluó la abundancia de *PhNAC024* por qPCR en los pétalos de las líneas transgénicas en los días comprendidos desde la antesis (día 0) hasta el marchitamiento de las corolas, comprendiendo muestreos en los días 3, 5, 6 y 8 según los genotipos (Fig. 22B). En ambas líneas sobre-expresantes los niveles de expresión de *PhNAC024* fueron elevados desde las etapas iniciales y se mantuvieron estables hasta su marchitamiento (día 5), mostrando claras diferencias respecto de la línea control en los días 0 y 3 y valores similares en el día 5, momento en el que los niveles de *PhNAC024* comenzaron a aumentar en la línea control (Fig. 22B). Por otro lado, las líneas de silenciamiento de *PhNAC024* mostraron perfiles de expresión similares entre sí y con la línea control. Sin embargo, la línea RNAi-38 mostró niveles de expresión mucho menores y significativos en todos los puntos de muestreo respecto de la línea control, a diferencia de la línea RNAi-26 que mostró expresión de *PhNAC024* ligeramente menor en las últimas cosechas (día 5 en adelante) (Fig.22B). Los resultados de expresión de *PhNAC024* en los pétalos se correlacionan con los niveles relativos observados en las hojas para cada línea (Fig. 18), demostrando que la línea RNAi-38 presenta mejor silenciamiento génico de *PhNAC024* en relación a la línea RNAi-26. Los datos de expresión de *PhNAC024* se correlacionan con las diferencias en la longevidad de los pétalos entre los distintos genotipos (Fig.22A), en donde la diferencia de longevidad entre las líneas de silenciamiento podría ser explicada por la falta de disminución en la expresión de *PhNAC024* en la línea RNAi-26 en las etapas iniciales de la SNP (Fig. 22B).



**Figura 22.** (A) Análisis de la longevidad de los pétalos en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC024*. La longevidad de los pétalos se determinó desde el momento de antesis de las flores hasta los primeros síntomas de marchitamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas utilizando ANOVA de un factor seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). (B) Análisis de expresión de *PhNAC024* en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico durante el avance de la senescencia natural de los pétalos (SNP). Los niveles de expresión de cada una de las líneas se muestran como la relación ( $\text{Log}_2$ ) entre cada punto de muestreo y el primer punto de muestreo de la línea Mitchell control y normalizados a la expresión del gen de referencia *PhEF1a*. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey. Para una mejor visualización, las letras del análisis de Tukey no son mostradas. En su lugar con asteriscos (\*) se indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada línea transgénica y la línea Mitchell control en cada punto de muestreo. En ambos gráficos las barras corresponden al error standard.

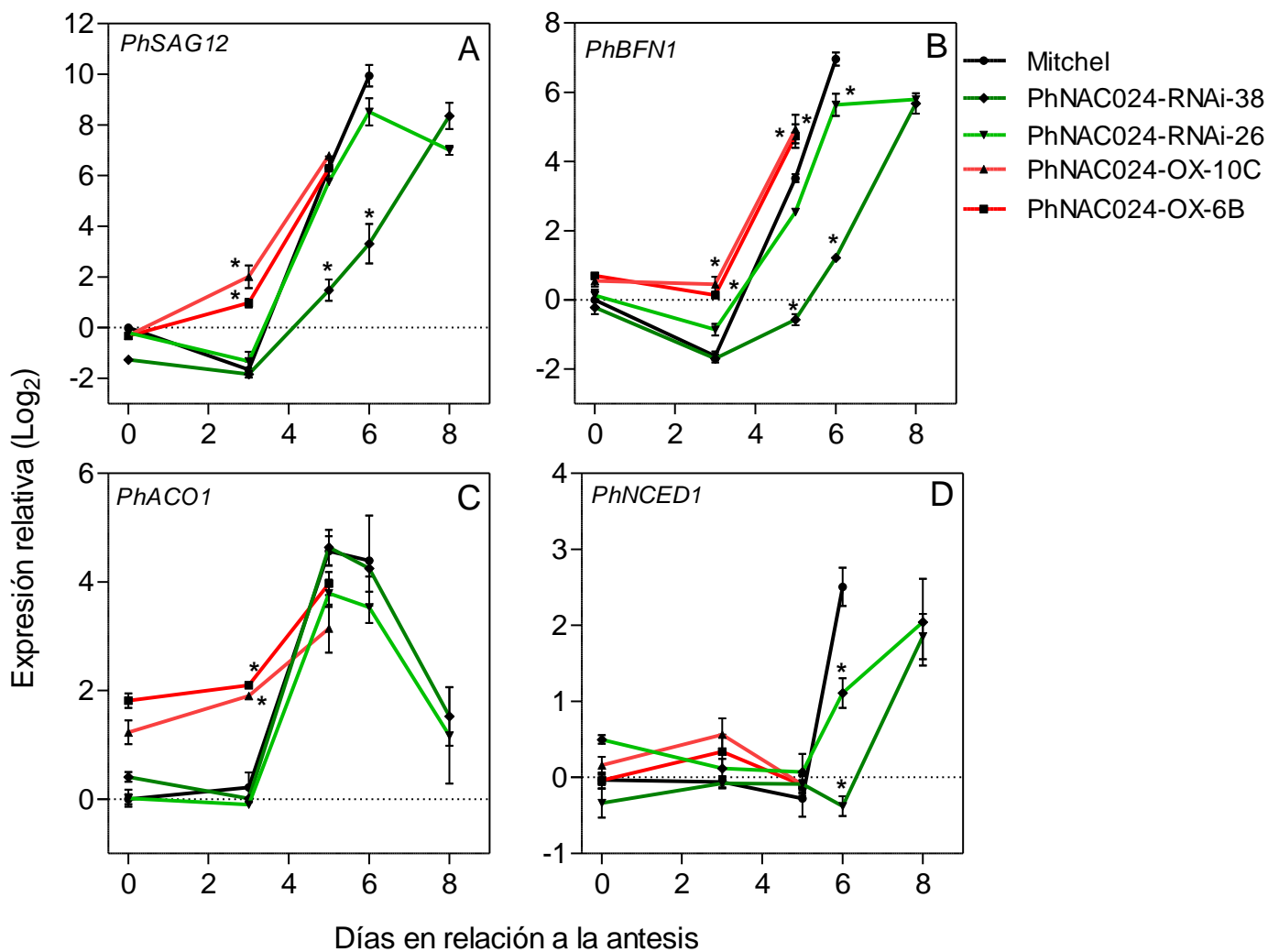
Con el objetivo de evaluar si las diferencias observadas en la longevidad de los pétalos en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento de *PhNAC024* se debe a una alteración en la SNP, se cuantificaron los niveles de expresión de algunos genes asociados a la senescencia, previamente cuantificados en la SNH, como *PhSAG12* y *PhBFN1* (Fig. 23A-B). Además, se evaluó la expresión de putativos ortólogos de genes asociados a la biosíntesis de hormonas involucradas en la regulación de la senescencia en especies etileno-sensibles, entre ellos, *ACO1* (*ACC OXIDASE 1*) que codifica una enzima involucrada en la biosíntesis de etileno, y *NCED1* (*9-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 1*) que codifica una enzima involucrada en la biosíntesis de ABA (Fig. 23C-D).

Los niveles de *PhSAG12* para las líneas sobre-expresantes fueron elevados desde etapas tempranas del proceso (día 3), mientras que para la línea control *PhSAG12* aumentó en etapas más tardías (día 5) (Fig. 23A), acorde a como fue observado previamente en plantas de *P. hybrida* (Fig. 2B). En la línea RNAi-38, el aumento de los niveles de *PhSAG12* fueron observados en estadios más tardíos, alcanzando valores similares que en la línea control, aunque con dos días de retraso (Fig. 23A). Por otro lado, en la línea RNAi-26 los niveles de *PhSAG12* fueron similares a los de la línea control (Fig. 23A). El comportamiento de *PhBFN1* resultó muy similar al de *PhSAG12*,

con mayores niveles de expresión desde etapas tempranas en ambas líneas sobre-expresantes, y niveles disminuidos en la línea RNAi-38 (días 5 y 6) en comparación con la línea control (Fig. 23B). De manera similar a lo observado para *PhSAG12*, la línea RNAi-26 mostró niveles de *PhBFN1* similares a los de la línea control, aunque en este caso con una leve disminución estadísticamente significativa en el día 6 respecto de la línea control (Fig. 23B).

Al analizar el gen involucrado en la biosíntesis de etileno, *PhACO1*, notamos que se encuentra aumentado en el día 3 en las líneas sobre-expresantes respecto de la línea control, la cual mantuvo niveles basales y aumentó significativamente en el día 5. Las líneas sobre-expresantes parecerían tener niveles elevados de *PhACO1* desde la antesis de los pétalos (día 0), aunque dichas diferencias no resultaron significativas (Fig. 23C). En las líneas de silenciamiento génico no se observaron diferencias con la línea control (Fig. 23C), aunque estas disminuyeron en el último muestreo (día 8). Por otro lado, los valores de *PhNCED1* se mantuvieron bajos en todas las líneas hasta el día 5. En la línea control aumentó bruscamente en el día 6, mientras que en las líneas de silenciamiento el aumento fue menor para la línea RNAi-26 y nulo para la línea RNAi-38. En ambas, *PhNCED1* aumentó en el día 8, alcanzando valores similares a los de la línea control en el día 6 (Fig. 23D).

Los resultados de expresión de los genes asociados a la senescencia (*PhSAG12* y *PhBFN1*), así como los genes de biosíntesis de hormonas (*PhACO1* y *PhNCED1*), en conjunto con la longevidad de los pétalos y la abundancia de transcritos de *PhNAC024* medidos en los pétalos para los distintos genotipos (Fig. 22 A-B), indican que *PhNAC024* actúa como un regulador positivo de la SNP en *P. hybrida*.



**Figura 23.** Análisis de expresión de genes asociados al avance de la senescencia natural en los pétalos (SNP) de las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC024*. (A y B) expresión relativa del gen marcador de senescencia *PhSAG12* y la nucleasa *PhBFN1*, respectivamente. (C y D) expresión relativa de genes asociados a la biosíntesis de etileno, *PhACO1*, y ácido abscísico (ABA), *PhNCED1*, respectivamente. Los niveles de expresión se muestran como la relación (Log<sub>2</sub>) entre cada punto de muestreo y el primer punto de muestreo de la línea Mitchell control y normalizados al gen de referencia *PhEF1a*. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey. Para una mejor visualización, las letras del análisis de Tukey no son mostradas. En su lugar con asteriscos (\*) se indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada línea transgénica y la línea Mitchell en cada punto de muestreo. Las barras corresponden al error standard.

### Análisis de las tasas fotosintéticas y rendimiento en las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de *PhNAC024*

Para estudiar si los efectos de *PhNAC024* sobre la senescencia foliar tienen algún impacto en la fotosíntesis, se midió el contenido de clorofila total y la tasa de fotosíntesis en hojas con distinta posición en el tallo principal en las líneas transgénicas en comparación con la línea control. Las plantas de los distintos genotipos fueron cultivadas en cámara de crecimiento utilizando niveles de irradiancia mayores a los previamente utilizados para la evaluación de la SNH y SNP (aprox. 450

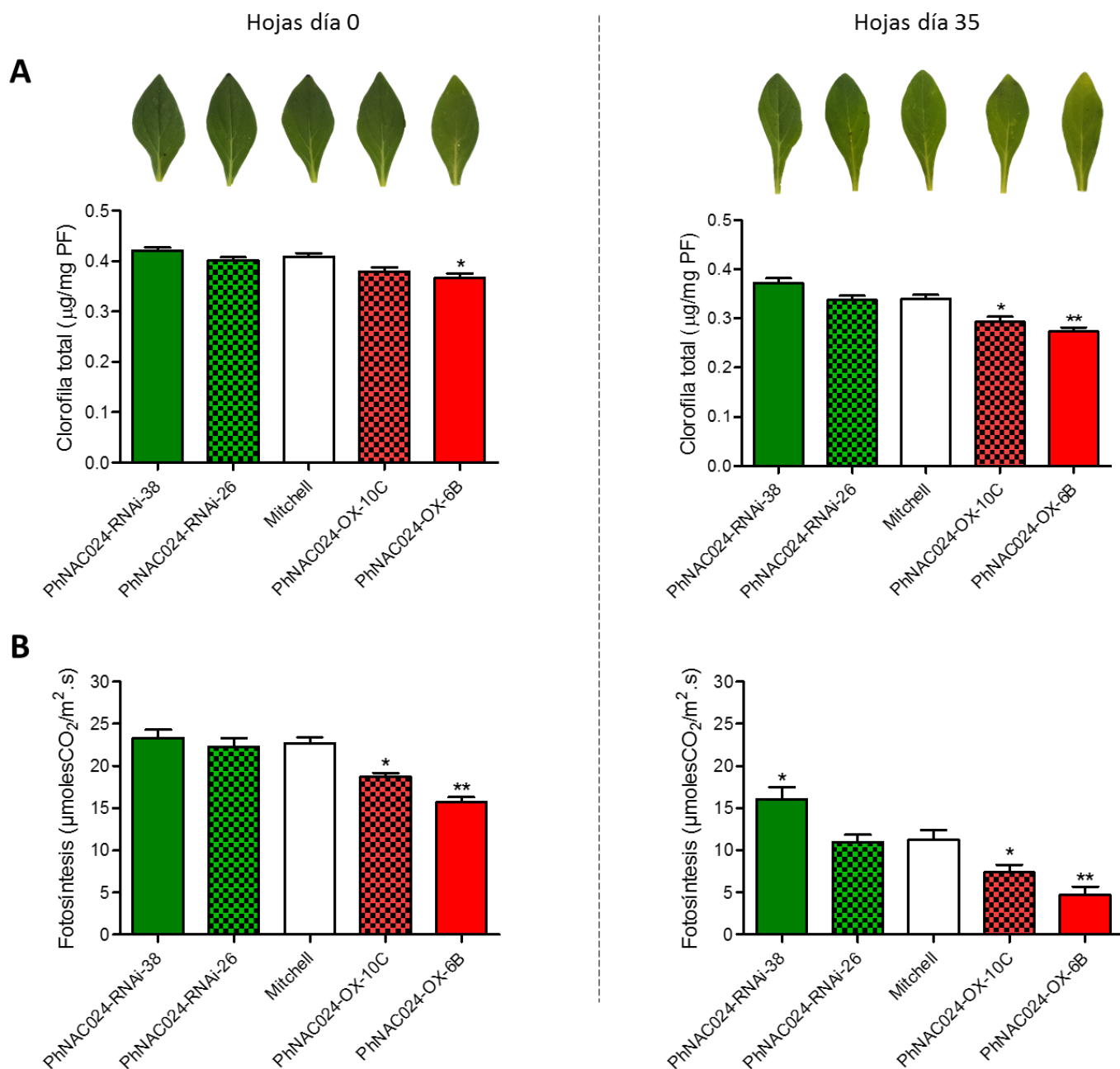
$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Los niveles de clorofila y fotosíntesis se evaluaron en dos posiciones del tallo principal. Una posición apical constituida por hojas jóvenes completamente expandidas (día 0 en relación a la máxima expansión) y una posición más basal constituida por hojas maduras (día 35 en relación a la máxima expansión).

En las hojas jóvenes (día 0), los valores de clorofila no mostraron diferencias significativas entre las líneas de silenciamiento génico y la control, mientras que las líneas sobre-expresantes mostraron una ligera tendencia de disminución, siendo esta diferencia significativa para la línea OX-6B (Fig. 24A). Los valores de fotosíntesis, medidos con un analizador portátil de gases de  $\text{CO}_2$  (*PPSystems*) en condiciones de PAR saturantes, mostraron que ambas líneas de silenciamiento tuvieron tasas de fotosíntesis similares a las de la línea Mitchell control, lo que se correlacionó con los valores de clorofila (Fig. 24A-B). Sin embargo, las líneas sobre-expresantes presentaron una marcada disminución en sus tasas de fotosíntesis, siendo más marcada en la línea OX-6B, correlacionándose con la ligera disminución en sus niveles de clorofila (Fig. 24A-B).

Por otro lado, en las hojas maduras (día 35), los niveles de clorofila tendieron a disminuir más en la línea control respecto de la línea de silenciamiento RNAi-38. Ambas líneas sobre-expresantes disminuyeron sus niveles de clorofila marcadamente en relación a la línea control (Fig. 24B). Las tasas de fotosíntesis mostraron un patrón similar a lo observado para la clorofila, con el valor más alto para la línea RNAi-38, valores similares para las líneas RNAi-26 y control, y valores más bajos para ambas líneas sobre-expresantes (Fig. 24B). Es interesante notar que, tanto en las hojas jóvenes como en las maduras, las disminuciones en las tasas de fotosíntesis de las líneas sobre-expresantes fueron más marcadas que sus respectivas disminuciones en los niveles de clorofila. A su vez, en las hojas maduras no se observaron diferencias en el contenido de clorofila entre la línea control y la línea RNAi-38, sin embargo, esta última mantuvo una tasa de fotosíntesis más alta (aprox. 45%) en relación a la línea Mitchell control (Fig. 24). Además de las tasas de fotosíntesis se midieron los valores de transpiración en las hojas, los cuales no arrojaron diferencias significativas entre los distintos genotipos (Anexo 3).

Los resultados indican que *PhNAC024* actuaría como un regulador positivo funcional de la senescencia foliar, capaz de modular la capacidad fotosintética en las hojas de *P. hybrida*.





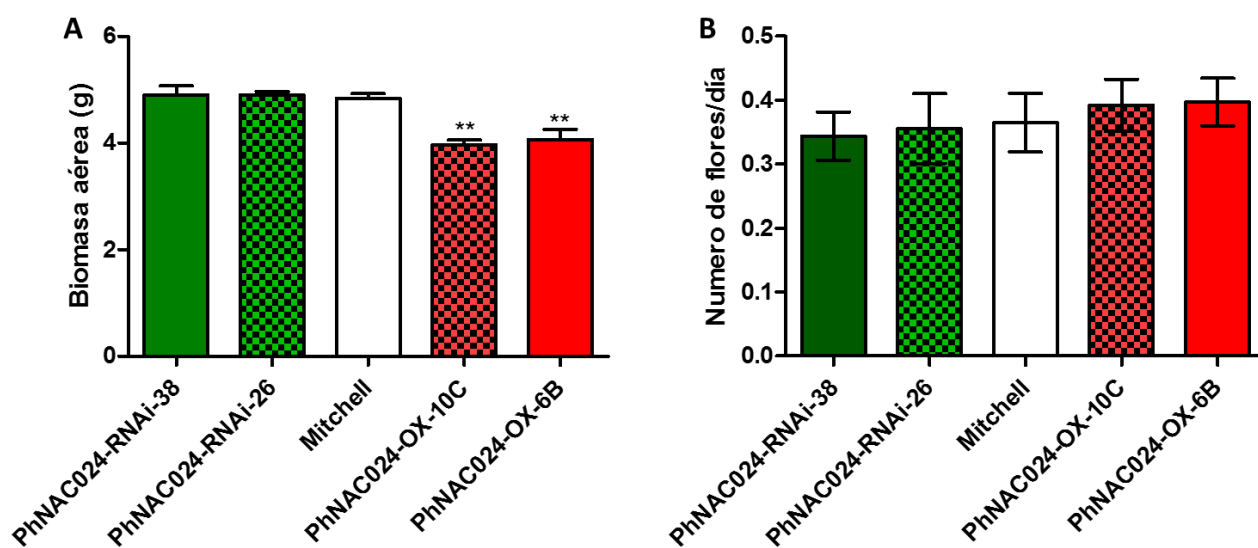
**Figura 24.** Evaluación de la tasa de fotosíntesis neta y contenido de clorofila en hojas jóvenes y maduras de las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC024*. Las plantas fueron cultivadas en cámara de crecimiento con fotoperiodo largo y alta irradiancia (aprox. 450  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). (A) Imágenes y contenido de clorofila de las hojas a los 0 y 35 días en relación a su máxima expansión. (B) Tasa de fotosíntesis neta medida con un analizador de gases de  $\text{CO}_2$  en condiciones de PAR saturantes. Los asteriscos indican diferencias significativas utilizando ANOVA de un factor seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras corresponden al error standard.

Para estudiar si las diferencias encontradas en las tasas de fotosíntesis entre las líneas transgénicas y la línea control afectan el rendimiento de las plantas, se cuantificó la producción de biomasa aérea y la tasa de producción de flores, ambos parámetros son importantes en la industria de plantas ornamentales (Fig. 25). La biomasa aérea se evaluó en plantas establecidas en la etapa reproductiva. Las líneas sobre-expresantes presentaron alrededor de un 20% menos de biomasa

respecto de la línea control, mientras que las líneas de silenciamiento génico no mostraron diferencias significativas para el momento ontológico en que fueron cosechadas (Fig. 25A).

La tasa de producción de flores fue similar entre los distintos genotipos, aunque se observó una leve tendencia en las líneas sobre-expresantes a producir más flores por unidad de tiempo (Fig. 25B).

Los resultados parecerían indicar que las menores tasas de fotosíntesis observadas en las hojas maduras de las líneas sobre-expresantes se correlacionan con una menor producción de biomasa aérea en las plantas, aunque sin afectar la tasa de producción de flores.



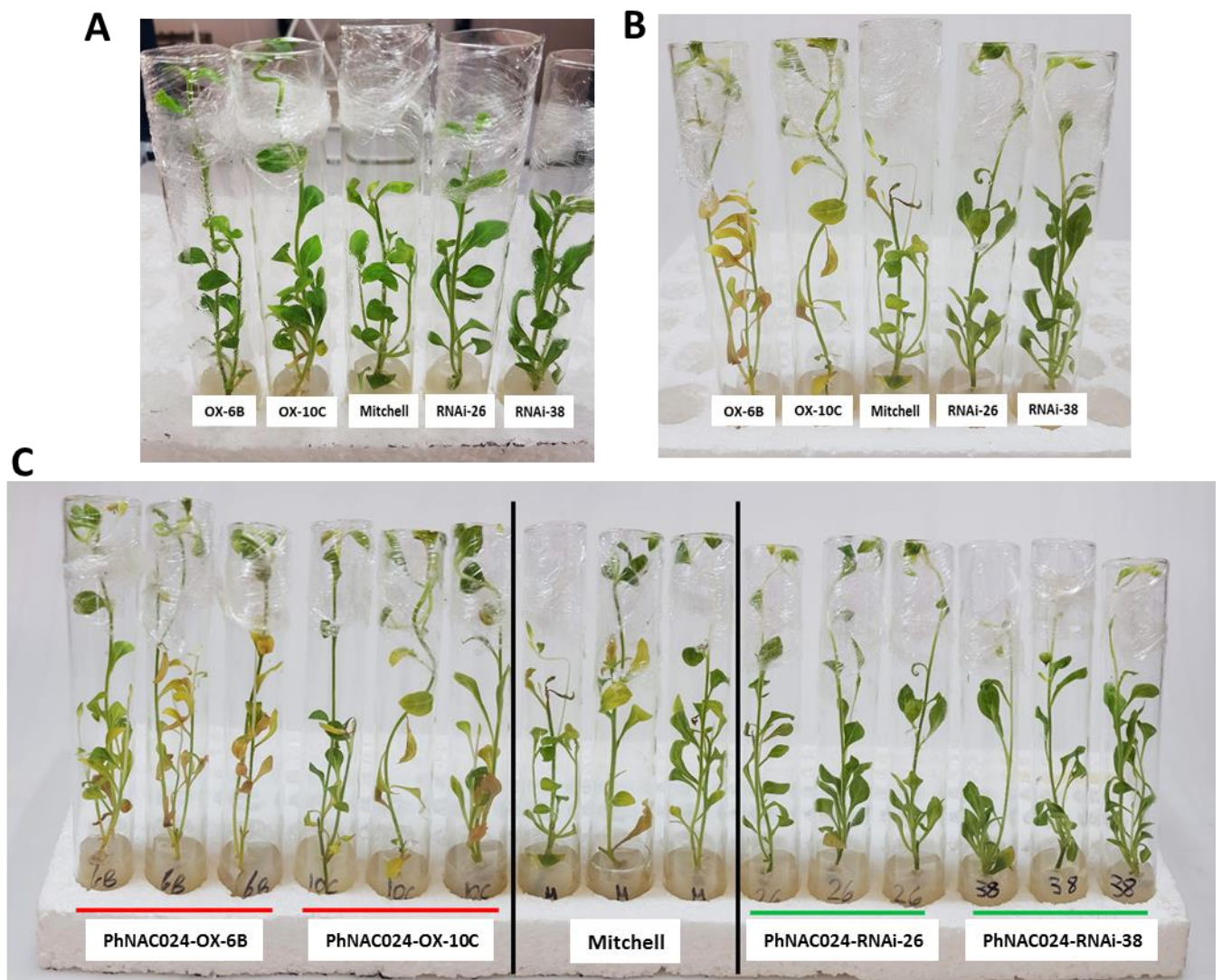
**Figura 25.** Análisis de rendimiento en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC024*. (A) Peso seco de la biomasa aérea de las plantas que fueron utilizadas para los ensayos de la Fig. 24. (B) Tasa de producción de flores. Los asteriscos indican diferencias significativas utilizando ANOVA de un factor seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras corresponden al error standard.

### Estudios preliminares asociados a la senescencia foliar inducida por oscuridad y ABA exógeno en las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de *PhNAC024*

Con el objetivo de estudiar si *PhNAC024* es además capaz de regular otros tipos de senescencia, se realizó un experimento de senescencia inducida por oscuridad. Además, se estudió la sensibilidad frente al agregado exógeno de ABA, una hormona reguladora de la senescencia. En ambos casos se utilizaron plantas adultas de los distintos genotipos cultivadas *in vitro*.

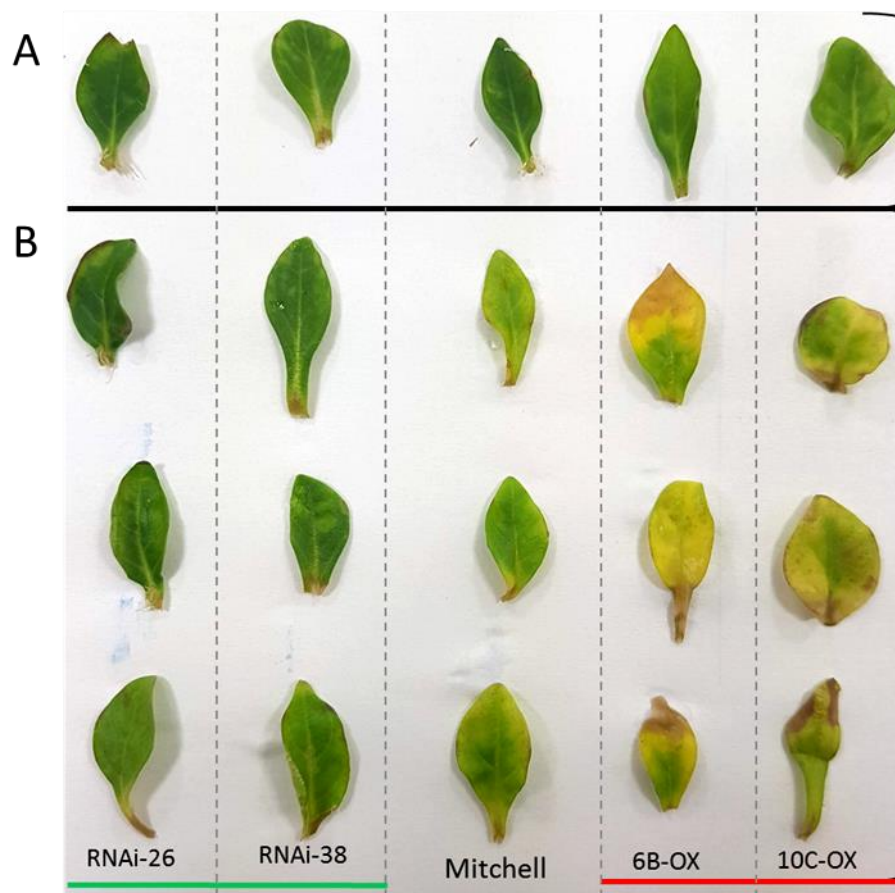
Para el ensayo de senescencia inducida por oscuridad, plantas cultivadas *in vitro* bajo condiciones de fotoperiodo largo fueron transferidas a oscuridad completa por 10 días, mientras que un grupo de plantas control de los distintos genotipos permaneció bajo condiciones lumínicas (Fig. 26). Los resultados muestran una clara diferencia en el grado de amarillamiento inducido en las plantas

enteras de cada línea. Ambas líneas sobre-expresantes mostraron un mayor número de hojas amarillentas luego del tratamiento de oscuridad en comparación con plantas control (Fig. 25B y C). Por otro lado, las líneas de silenciamiento génico se vieron muy poco afectadas por el tratamiento de oscuridad en comparación con la línea Mitchell control que presentó un mayor número de hojas amarillentas (Fig. 25B y C). Las plantas de los distintos genotipos que se mantuvieron en la cámara de crecimiento (controles), no mostraron diferencias de coloración en términos visuales entre los genotipos durante el tiempo que duró el experimento (Fig. 25A). Si bien es necesario realizar mediciones de los parámetros fisiológicos y moleculares y complementar además con nuevos ensayos, las observaciones indican que *PhNAC024* estaría regulando la senescencia inducida por oscuridad.



**Figura 26.** Análisis de senescencia inducida por oscuridad en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC024*. (A) Plantas adultas que fueron mantenidas bajo condiciones lumínicas (control). (B y C) Plantas adultas cultivadas *in vitro* fueron transferidas a 10 días de oscuridad completa

Para el ensayo de sensibilidad al ABA, hojas de los distintos genotipos de plantas cultivadas *in vitro* fueron cortadas y transferidas a placas de petri conteniendo medio basal (WPM) con el agregado de ABA (80  $\mu$ M) por un periodo de 7 días (Fig. 27). Como tratamiento control, hojas equivalentes de los distintos genotipos fueron transferidas a placas de petri contenido medio WPM sin el agregado de la hormona. Las hojas control no mostraron síntomas de amarillamiento para ninguno de los genotipos evaluados en el tiempo que duró el ensayo (Fig. 27A). En presencia de ABA, al momento en que las hojas de la línea control presentaron los primeros síntomas de amarillamiento, las hojas de las líneas sobre-expresantes mostraron un grado de amarillamiento casi total (Fig. 27B). En contraparte, las hojas de las líneas de silenciamiento génico se mantuvieron verdes y sin mostrar signos de amarillamiento visible (Fig. 27B). Si bien es necesario realizar más experimentos y mediciones de parámetros fisiológicos y moleculares, las observaciones indican que *PhNAC024* podría estar modulando la promoción de la senescencia foliar a través de cambios en la sensibilidad al ABA.

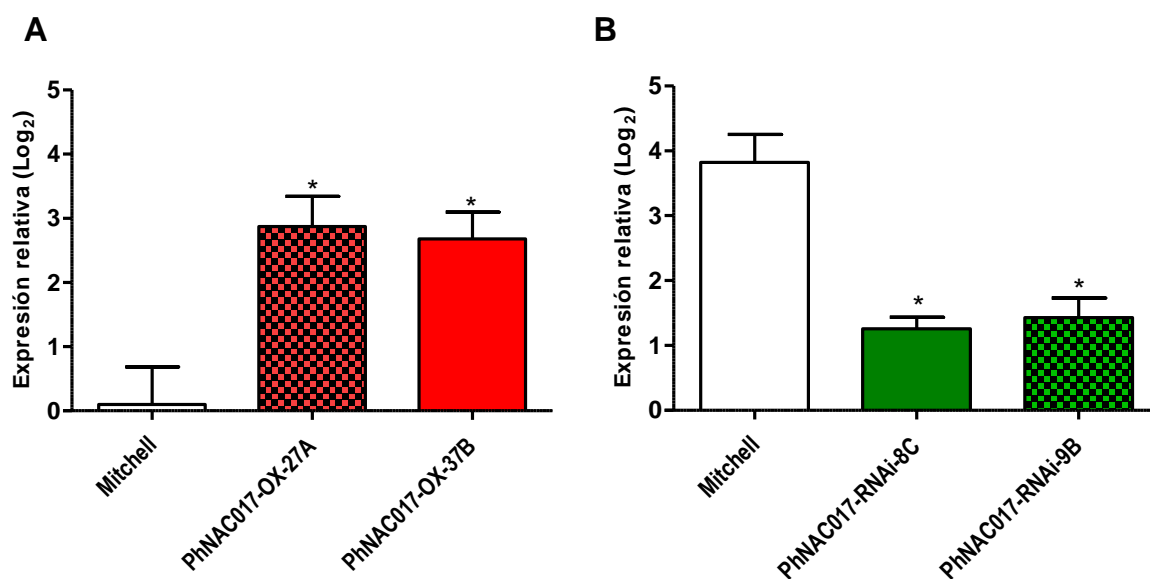


**Figura 27.** Análisis de senescencia inducida por ácido abscísico (ABA) en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC024*. Hojas de plantas cultivadas *in vitro* fueron transferidas por siete días a placas de Petri conteniendo medio WPM sin ABA (A) y medio WPM suplementado con ABA (80  $\mu$ M) (B).

## Evaluación de la senescencia en plantas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento génico de *PhNAC017*

De manera similar a la caracterización realizada para las líneas transgénicas de *PhNAC024*, para evaluar la abundancia de transcritos de *PhNAC017* en las líneas transgénicas generadas se realizó un ensayo preliminar con un número reducido de plantas. Para cada genotipo se cosecharon en nitrógeno líquido muestras de la hoja 7 del tallo principal en dos momentos diferentes del desarrollo foliar en relación a la máxima expansión. Se realizaron extracciones de ARN seguidas de retro-transcripción y posteriormente se realizaron reacciones de qPCR utilizando oligonucleótidos específicos para *PhNAC017* y el gen de referencia *PhEF1a*.

El gen *PhNAC017* mostró niveles de expresión mínimos en hojas jóvenes totalmente expandidas (Fig. 8B), con lo cual se utilizó este momento del desarrollo de las hojas para medir la abundancia de transcritos en las líneas sobre-expresantes de *PhNAC017* (Fig. 28A). La abundancia de transcritos de *PhNAC017* en dicho estadio fue mayor en las dos líneas seleccionadas de sobre-expresión, PhNAC017-OX-27A y PhNAC017-OX-37B, en relación a la línea Mitchell control (Fig. 28A). Por otro lado, los niveles de transcritos en las líneas de silenciamiento génico fueron medidos en hojas con síntomas visibles de senescencia (inicio de síntomas de amarillamiento), ya que en ese estadio *PhNAC017* se encuentra en niveles elevados en plantas control (Fig. 8B). Los niveles de expresión de *PhNAC017* en las líneas de silenciamiento seleccionadas, PhNAC024-RNAi-8C y PhNAC024-RNAi-9B, fueron menores respecto de la línea control (Fig. 28B). En base a la expresión de *PhNAC017* en las líneas transgénicas, los resultados indican que las mismas son idóneas para estudiar la función en senescencia de *PhNAC017*.

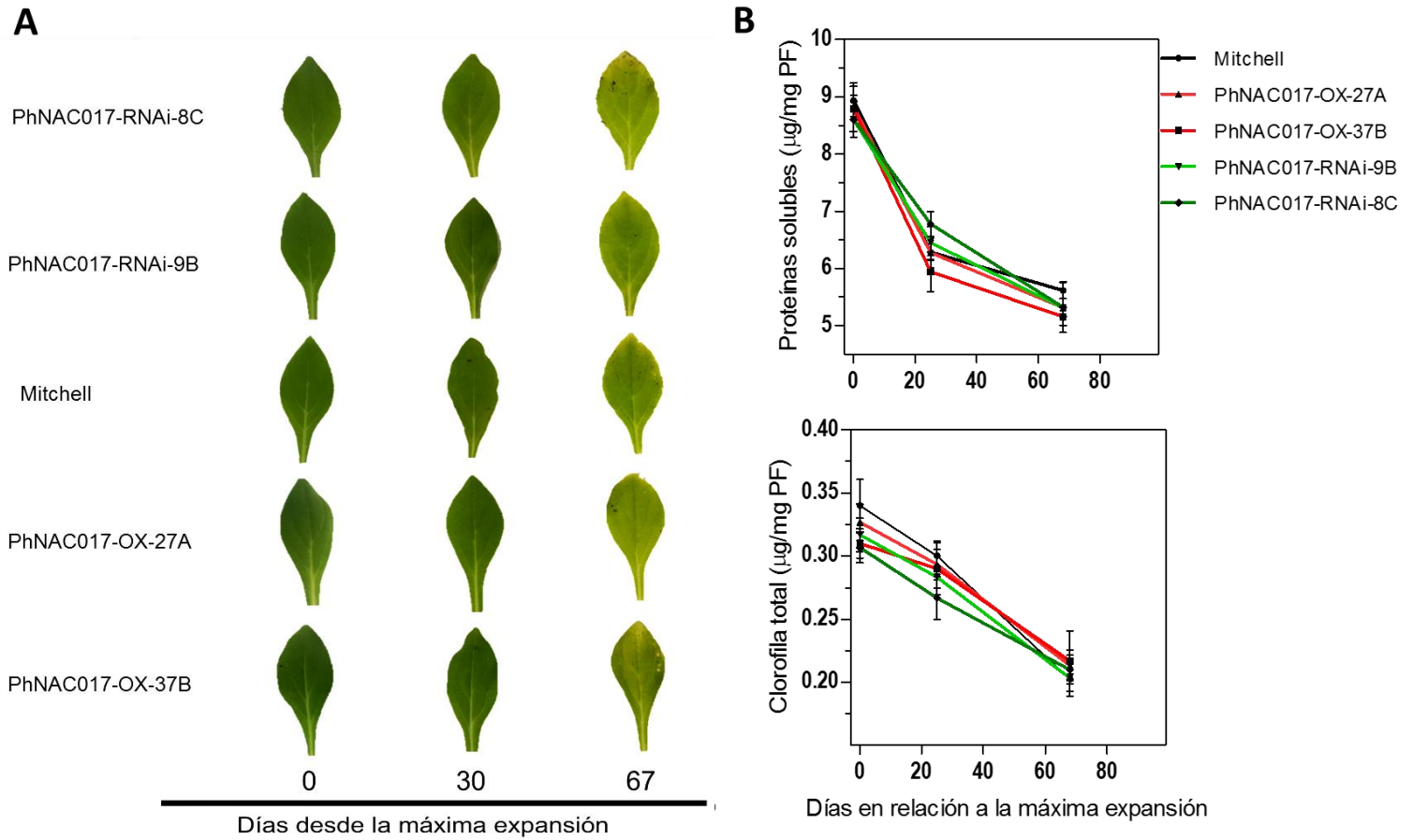


**Figura 28.** Análisis de expresión en las líneas seleccionadas de sobre-expresión y silenciamiento génico de *PhNAC017*. (A) Los niveles de expresión de *PhNAC017* en las líneas sobre-expresantes fueron evaluados en una hoja joven totalmente expandida. Los valores se muestran en relación a los valores de la línea Mitchell control. (B) Los niveles de expresión de *PhNAC017* en las líneas de silenciamiento

fueron evaluados en una hoja con síntomas de amarillamiento. Los valores se muestran en relación a los valores de las hojas jóvenes de la línea Mitchell (panel A). Los niveles de expresión (Log2) fueron normalizados a la expresión del gen de referencia *PhEF1a*. Los asteriscos indican diferencias significativas utilizando ANOVA de un factor seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras corresponden al error standard. El análisis estadístico es independiente para cada panel.

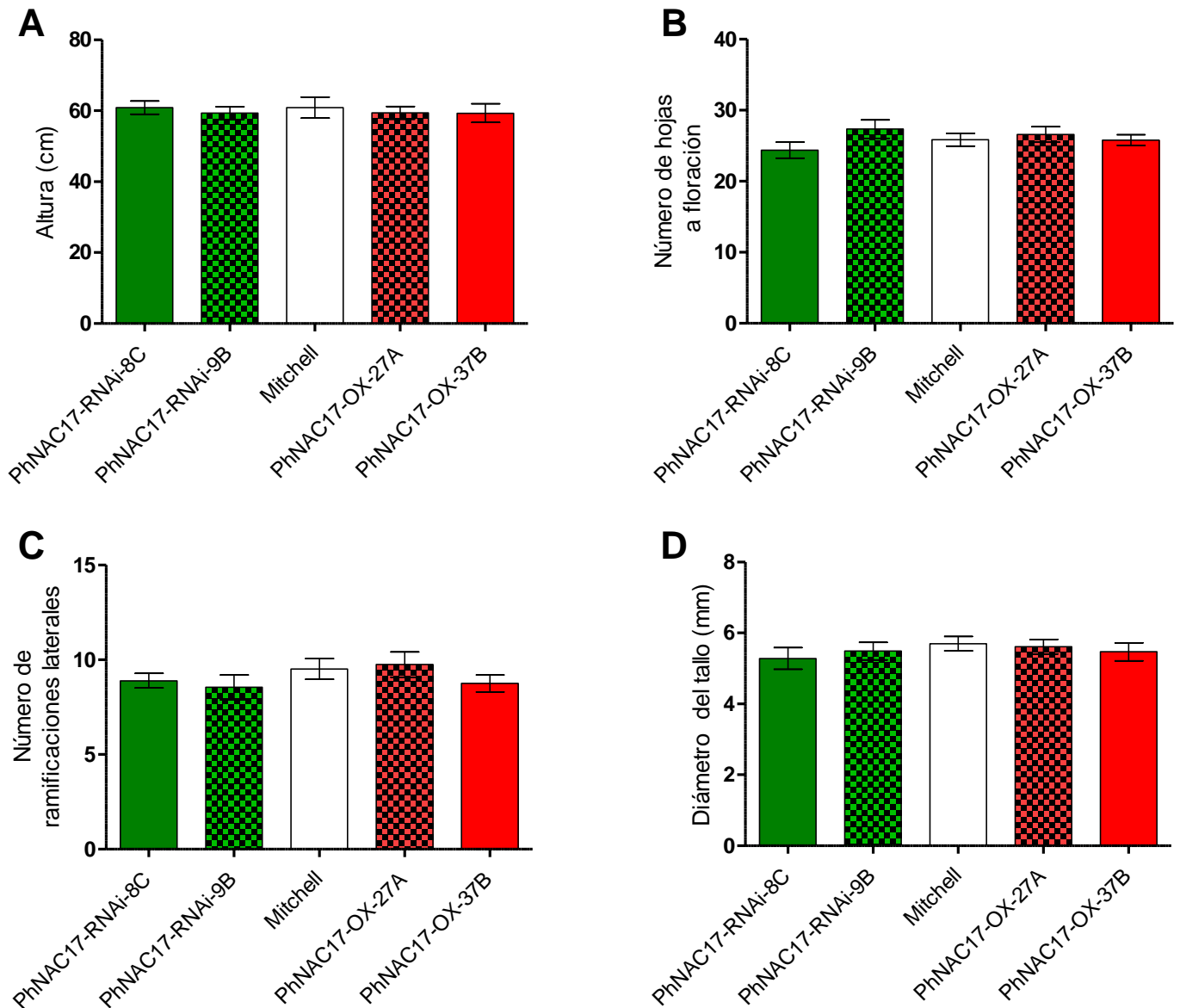
### **Estudios fisiológicos asociados al avance de la senescencia foliar en líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de *PhNAC017***

Con el objetivo de caracterizar el rol de *PhNAC017* en la senescencia foliar de *P. hybrida*, se analizó la progresión de la SNH en las líneas transgénicas de *PhNAC017* en comparación con la línea Mitchell control. Para cada genotipo se marcó la hoja 7 del tallo principal y se cosecharon muestras en distintos momentos del desarrollo foliar desde el día en que las hojas alcanzaron su máxima expansión (día 0), hasta los primeros síntomas de amarillamiento de cada genotipo. Los muestreos se realizaron en los días 0, 30 y 67 en relación a la máxima expansión foliar. La longevidad de las hojas fue similar para los distintos genotipos (Fig. 29A). Los niveles de los parámetros fisiológicos asociados al avance de la SNH como clorofila y proteínas solubles evolucionaron sin mostrar diferencias significativas entre los distintos genotipos (Fig. 29B). Los resultados indican que *PhNAC017* no estaría regulando la senescencia foliar en petunia, por tal motivo no se avanzó con la caracterización de parámetros moleculares en las hojas.



**Figura 29.** Análisis de la senescencia natural foliar (SNH) en líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC017*. (A) Imágenes de las hojas cosechadas en los días 0, 30 y 67 que corresponden a los días desde que las hojas alcanzaron su máxima expansión hasta que mostraron los primeros síntomas de amarillamiento según los distintos genotipos. (B) Contenido de clorofila total y proteínas solubles. Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey ( $p < 0,05$ ). Las barras indican el error estándar.

Luego se evaluó si *PhNAC017* es capaz de alterar diferentes parámetros asociados a la morfología de las plantas como la altura, el número de ramificaciones laterales, el diámetro del tallo principal, así como el tiempo a floración (Fig. 30). No se detectaron diferencias significativas entre los genotipos para ninguna de las variables evaluadas, por lo que *PhNAC017* parecería no afectar la arquitectura de las plantas ni el tiempo a floración.



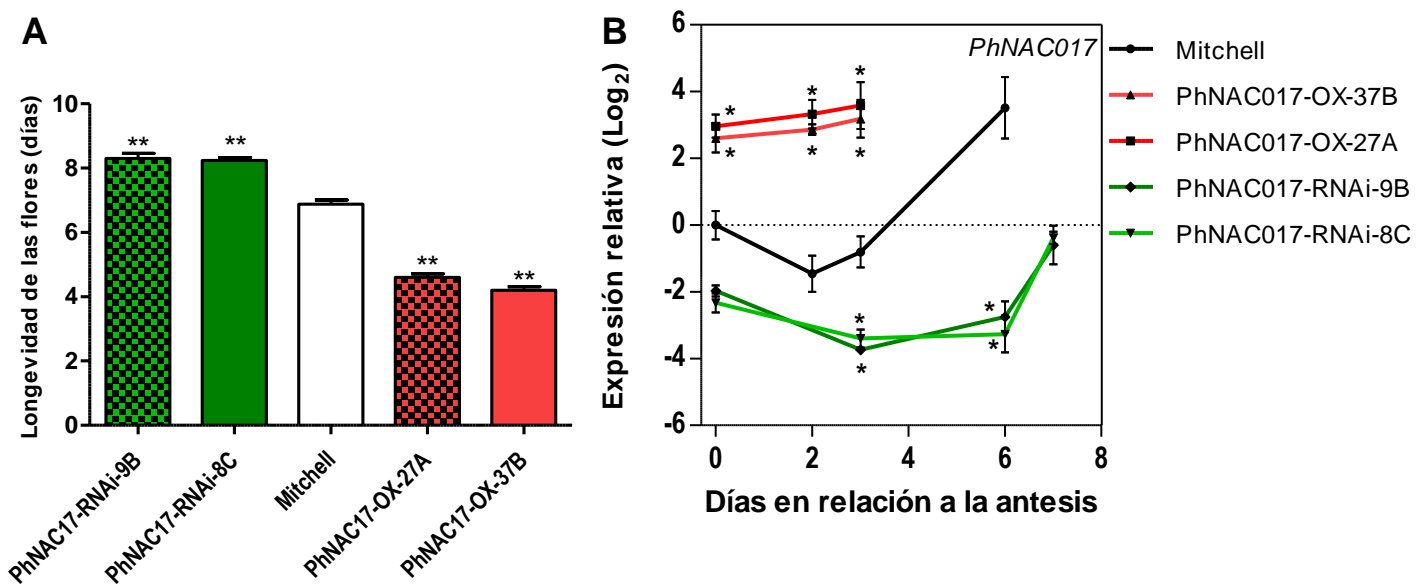
**Figura 30.** Características morfológicas y tiempo a floración en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC017*. (A) Altura total, medida desde la base de las plantas hasta la transición del tallo principal a la fase reproductiva. (B) Tiempo a floración, evaluado a través de la cuantificación del número de hojas del tallo principal hasta su transición a la fase reproductiva. (C) Número de ramas laterales del tallo principal. (D) Diámetro del tallo principal. Las mediciones se realizaron en plantas adultas al momento en que presentaron las primeras flores. Se realizó análisis de la varianza (ANOVA) seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras indican el error estándar.

### Estudios fisiológicos y moleculares asociados al avance de la senescencia en los pétalos de las líneas de sobre-expresión y silenciamiento génico de *PhNAC017*

Posteriormente, se decidió estudiar un posible rol de *PhNAC017* en la regulación de la senescencia en los pétalos (SNP y SIP). Al igual que en las líneas transgénicas de *PhNAC024*, no se observaron diferencias en la longevidad en los pétalos entre los distintos genotipos durante la SIP (datos no mostrados). Por otro lado, se evaluó la longevidad de los pétalos en las líneas sobre-



expresantes y de silenciamiento en flores sin polinizar (SNP) (Fig. 31A). Las líneas de sobre-expresión de *PhNAC017* presentaron una longevidad marcadamente reducida en los pétalos (aprox. 4 días) en comparación a las flores de la línea control (aprox. 7 días) (Fig. 31A), mientras que ambas líneas de silenciamiento génico mostraron longevidad mayor en relación a la línea control (aprox. 8 días) (Fig. 31A). Seguidamente se evaluó la abundancia de transcritos de *PhNAC017* en los pétalos de las líneas transgénicas en los días comprendidos desde la antesis (día 0) hasta el marchitamiento de las corolas (días 2, 3, 6 y 7) en los distintos genotipos (Fig. 31B). Acorde a lo observado previamente en plantas control de *P. hybrida* (Fig. 9D), la expresión de *PhNAC017* en la línea Mitchell aumenta acorde avanza la SNP (Fig. 31B). En ambas líneas sobre-expresantes los niveles de *PhNAC017* se encuentran elevados desde las etapas iniciales de la SNP y se mantuvieron constantes a lo largo del proceso en comparación con la línea control (desde el día 0 al día 3) (Fig. 31B). En contraposición, las líneas de silenciamiento mostraron niveles de expresión mucho menores a los de la línea control en todos los puntos de muestreo (desde el día 0 al día 6) (Fig. 31B). Los resultados indican que *PhNAC017* estaría regulando la SNP en *P. hybrida*, ya que la longevidad de los pétalos de cada línea independiente se correlacionaron con los niveles de expresión de *PhNAC017*.

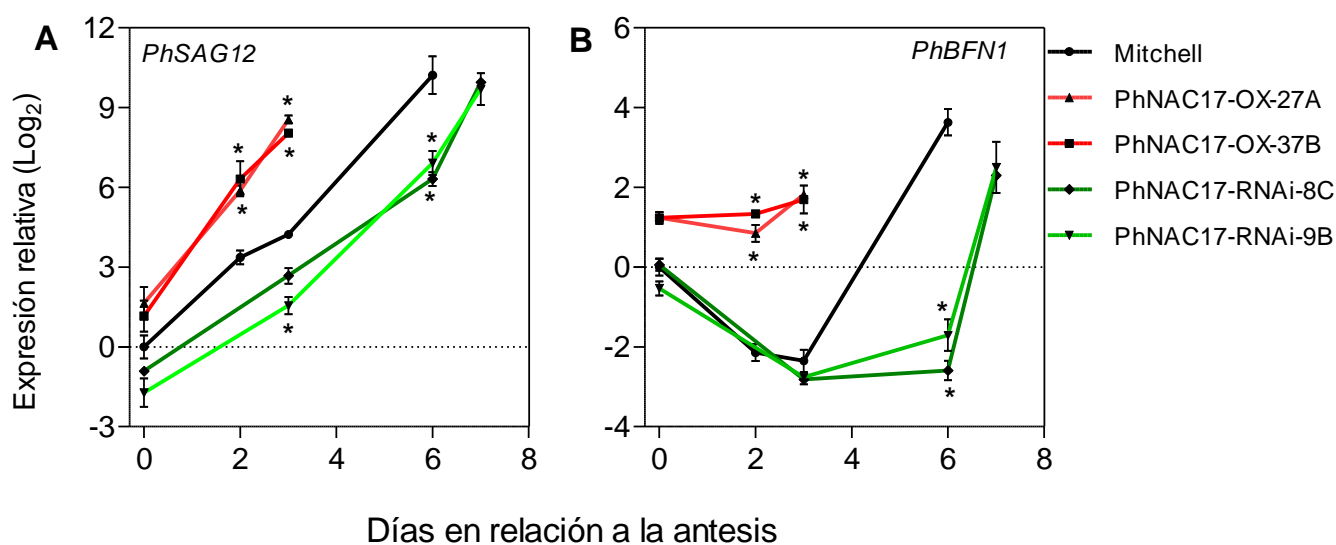


**Figura 31.** (A) Análisis de la senescencia natural en los pétalos (SNP) de las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC017*. La longevidad de los pétalos se determinó desde la antesis hasta los primeros síntomas de marchitamiento de las corolas. Los asteriscos indican diferencias significativas utilizando ANOVA de un factor seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras corresponden al error standard. (B) Análisis de expresión de *PhNAC017* durante la progresión de la SNP en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC017*. Los niveles de expresión de cada una de las líneas se muestran como la relación ( $\text{Log}_2$ ) entre cada punto de muestreo y el primer punto de muestreo de la línea Mitchell control y normalizados a la expresión del gen de referencia *PhEF1a*. Los datos fueron sometidos a ANOVA de dos factores seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey. Para una mejor visualización, las letras del análisis de Tukey no son mostradas. En su lugar con asteriscos (\*) se indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada línea transgénica y la línea Mitchell control en cada punto de muestreo. En ambos gráficos las barras corresponden al error standard.

Para determinar si las diferencias observadas en la longevidad de los pétalos se deben efectivamente a una alteración en la SNP, se evaluaron los niveles de expresión de genes asociados a la senescencia como *PhSAG12* y *PhBFN1* (Fig. 32A y B).

Los perfiles de expresión de *PhSAG12* aumentaron durante la SNP en todos los genotipos (Fig. 32A). La expresión en las líneas sobre-expresantes fue elevada desde etapas tempranas del proceso (día 2) en relación a la línea control, mientras que en esta última la expresión aumentó de forma menos pronunciada (Fig. 32A). En el caso de las líneas de silenciamiento, los niveles de *PhSAG12* siempre estuvieron por debajo de los valores de la línea control. Ambas líneas alcanzaron similares valores que los de la línea control, pero con unos días de retraso, en contraposición a lo que se produjo en las líneas sobre-expresantes, en donde aumentaron de forma prematura (Fig. 32A). Por otro lado, los niveles de la nucleasa *PhBFN1* se encontraron muy elevados en las líneas sobre-expresantes desde etapas tempranas y se mantuvieron constantes en comparación con la línea control (Fig. 32B). Por el contrario, en las líneas de silenciamiento *PhBFN1* se mantuvo con niveles bajos y similares a los de la línea control en las etapas iniciales, pero aumentó considerablemente en los días 6 y 7 (Fig. 32B). En etapas tardías, las líneas de silenciamiento presentaron una clara disminución en los niveles de *PhBFN1* respecto de la línea control (Fig. 32B).

Los resultados indican que *PhNAC017* actuaría como un promotor de la SNP en *P. hybrida*, posiblemente modulando la expresión de genes asociados a la senescencia como *PhSAG12* y *PhBFN1*.



**Figura 32.** Análisis de expresión de genes asociados al avance de la senescencia natural en los pétalos (SNP) de las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC017*. (A y B) expresión relativa del gen marcador de senescencia *PhSAG12* y la nucleasa *PhBFN1*, respectivamente. Los niveles de expresión (escala Log2) se muestran como la relación (Log2) entre cada punto de

muestreo y el primer punto de muestreo de la línea Mitchell control y normalizados a la expresión del gen de referencia *PhEF1a*. Los datos fueron sometidos a ANOVA de dos factores seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey. Para una mejor visualización las letras correspondientes al análisis de Tukey no se muestran. En su lugar con asteriscos (\*) se indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada línea transgénica y la línea Mitchell control en cada punto de muestreo. En ambos gráficos las barras corresponden al error standard.

## DISCUSIÓN

La senescencia foliar constituye el último estadio del desarrollo de las hojas, en el cual se observa una declinación de la actividad fotosintética, un activo desensamblado de las macromoléculas, y el reciclado de los nutrientes generados durante este catabolismo hacia otras regiones en desarrollo (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). En distintas especies, este proceso puede ser desencadenado por señales endógenas como la edad o la transición a la fase reproductiva, así como por distintos tipos de estrés (Balazadeh *et al.*, 2008). En muchas especies, el retraso del inicio de la senescencia ha conferido múltiples ventajas, incluyendo mejoras en el rendimiento y en ciertas características agronómicas (Luoni *et al.*, 2019). En cultivos ornamentales el retraso de la senescencia en hojas y flores representa una característica de gran importancia que impacta en el valor de estos productos. En estos cultivos, no es estrictamente necesaria la obtención de variedades *stay-green* funcionales, ya que la generación de plantas con fenotipo *stay-green* no funcional o cosméticas es igualmente relevante en los programas de mejoramiento. Por lo tanto, el objetivo de la presente tesis fue identificar potenciales reguladores del inicio y progresión de la senescencia foliar y de los pétalos en *P. hybrida*. Inicialmente se realizaron estudios de la progresión de la senescencia en hojas y pétalos de petunia que involucraron la caracterización de la SNH, SNP y SIP (Capítulo 1). A continuación, se identificaron genes de las familias de factores de transcripción NAC y WRKY en *P. hybrida* (Capítulo 2). Posteriormente, se realizaron estudios de expresión y filogenéticos para definir una lista de genes candidatos que podrían regular distintos tipos de senescencia en petunia (Capítulo 3). Finalmente, se estudió la función en senescencia de dos candidatos de la familia NAC a través de la generación y evaluación de plantas sobre-expresantes y de silenciamiento génico (Capítulo 4), permitiendo identificar reguladores de la senescencia foliar y/o de los pétalos en *P. hybrida*.

### **Estudio de la progresión de la senescencia foliar y floral en *P. hybrida* a través de la cuantificación de parámetros fisiológicos y moleculares**

Inicialmente se estudió la progresión de la senescencia en hojas y pétalos de petunia, evaluando parámetros fisiológicos y moleculares en distintos momentos del desarrollo de estos órganos para determinar no sólo como ocurren estos procesos, sino también para dilucidar la ventana temporal adecuada que nos permita detectar potenciales biomarcadores bajo nuestras condiciones experimentales. Esto fue particularmente necesario para establecer la progresión de la SNH en *P. hybrida* (Fig. 1), ya que los procesos inherentes a los tipos de senescencia que ocurren en los pétalos ya han sido descritos en *P. hybrida* (Langston *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2015). El cultivar de *P. hybrida* utilizado en esta tesis al momento de comenzar los experimentos fue la variedad comercial *P. hybrida* cv 'Ultra White' la cual podría presentar ciertas diferencias en

la progresión de la senescencia floral respecto a la variedad 'Mitchell Diploid' comúnmente utilizada en investigación (Broderick y Jones, 2014)(Fig. 2 y 3).

El inicio de la senescencia en las hojas depende de la fase del desarrollo foliar. Una hoja joven que no ha alcanzado cierta maduración suele ser insensible a los estímulos que desencadenan la senescencia (Schippers *et al.*, 2015a). Cuando el área foliar es cercana a la máxima expansión, la hoja es capaz de comenzar a percibir señales tanto endógenas como exógenas inductoras de la senescencia. En base a esta información, para el experimento de SNH los muestreos comenzaron desde un momento cercano a la máxima expansión foliar (día -3). La misma se determinó cuantificando la evolución del área foliar desde que era un primordio hasta que se produjo el cese del crecimiento. Bajo nuestras condiciones de cultivo, el tiempo cronológico en producirse la máxima expansión de la hoja seleccionada fue de 8 días aproximadamente (datos no mostrados). Aproximaciones similares fueron previamente reportadas en *Arabidopsis* (Breeze *et al.*, 2011).

La senescencia foliar se caracteriza por la degradación y pérdida de la clorofila en sus células, así como por la degradación de macromoléculas (Buet *et al.*, 2019; Tamary *et al.*, 2019). Los parámetros fisiológicos y moleculares asociados a la progresión de la SNH en petunia siguieron un patrón similar al observado en *Arabidopsis*, así como en otras dicotiledóneas y monocotiledóneas, confirmando que la senescencia foliar es un proceso conservado evolutivamente (Fig.1) (Chiba *et al.*, 2003; Balazadeh *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008; Price *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Woo *et al.*, 2010; Breeze *et al.*, 2011; Ono *et al.*, 2013). El amarillamiento de las hojas y la pérdida de clorofila fueron notorios recién en estadios tardíos de la senescencia, mientras que los niveles de proteínas solubles y de la subunidad mayor de la Rubisco (*RbcL*), decayeron en estadios intermedios (Fig. 1A, B, E y F). La expresión relativa de putativos ortólogos de genes ampliamente reportados como marcadores de senescencia (Gombert *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2012), *PhSAG12* y *PhCAB2*, comenzaron su tendencia a aumentar y/o disminuir en estadios intermedios del proceso, respectivamente (Fig. 1C y D). Los niveles de transcritos de *SAG12*, a diferencia de otros *SAGs* que presentan una expresión basal durante el desarrollo de las hojas, ha sido reportada de aumentar exclusivamente en hojas senescentes (Grbic, 2002) sugiriendo que, al igual que en otras especies, algunos aspectos de la senescencia foliar en petunia comienzan a evidenciarse de forma más temprana que los síntomas visuales de amarillamiento y pérdida de clorofila (Gomber *et al.*, 2006). De hecho, Breeze *et al.* (2011) propuso que la degradación temprana de la Rubisco, y por consiguiente sus subunidades como *RbcL* (Fig.1E), podría contribuir con la síntesis de proteínas requeridas para las primeras etapas de la senescencia sin afectar significativamente las tasas de fotosíntesis. Observamos además que la disminución en los niveles de *RbcL* se condicen con los niveles de proteínas solubles (Fig. 1B y E). Se podría inferir entonces que los niveles de proteínas solubles y los niveles de expresión *PhCAB2* serían parámetros más

precisos para detectar las transiciones entre los estadios tempranos e intermedios de la senescencia foliar en *P. hybrida*; mientras que la expresión de *PhSAG12* parecerían reflejar los estados entre intermedios y tardíos. Por último, los niveles de clorofila total, así como los síntomas visuales de amarillamiento serían parámetros que reflejan estadios tardíos del proceso. En conjunto, los distintos parámetros fisiológicos y moleculares evaluados nos permitieron realizar un seguimiento temporal de la SNH en *P. hybrida*.

Las flores de petunia son etileno-sensibles, por lo que la senescencia que ocurre en los pétalos depende principalmente de la producción de etileno. Esta hormona aumenta rápidamente en las corolas cuando la flor es polinizada (18 h), y de forma mucho más tardía (8 días) cuando la flor senesce de forma natural, es decir en ausencia de polinización (Reid y Wu, 1992; Broderick *et al.*, 2014; Thomas, 2003). En el presente trabajo no se midieron los niveles de etileno, aunque observamos que los procesos de SIP y SNP en el cultivar 'Ultra White' ocurren de manera similar a lo descrito en otros cultivares (Jones *et al.*, 2005; Chapin y Jones, 2007; Jones *et al.*, 2014). En la SNP, los niveles de proteínas solubles decaen desde etapas tempranas de manera gradual con el paso de los días hasta alcanzar niveles muy por debajo respecto del valor inicial, mientras que *PhSAG12* aumenta abruptamente en las etapas tardías del proceso, con una duración de 11 días desde la antesis (Fig. 2). Por otro lado, cuando las flores son polinizadas, los niveles de proteínas solubles disminuyeron en etapas tempranas (6 h) aunque este decaimiento se detiene manteniéndose en los mismos niveles, sin continuar su descenso, mientras observamos un brusco incremento de *PhSAG12* en las etapas intermedia/tardías del proceso, con una duración de 72 h (Fig. 3). Si bien no se evaluó la actividad proteasa en las corolas de petunia, se estima una alta actividad en las etapas tardías debido a la disminución en los niveles de proteínas solubles y al aumento de la expresión de *PhSAG12* en ambos tipos de senescencia como ha sido previamente reportado (Jones *et al.* 2005). En conjunto, los parámetros fisiológicos y moleculares utilizados nos permitieron realizar un seguimiento temporal de ambos tipos de senescencia en las flores de *P. hybrida*. Las diferencias entre los niveles de proteínas solubles removilizadas en ambos tipos de senescencia floral podría explicarse por el hecho de que dichos procesos tendrían diferentes programas de removilización debido principalmente a que poseen diferentes destinos o sumideros (Chapin y Jones, 2007). De esta manera, los nutrientes de una flor polinizada irían a los ovarios en desarrollo, mientras que los nutrientes de flores no polinizadas serían removilizados a otras regiones de la planta externas a la flor (Chapin y Jones, 2007; Jones, 2013).

## **Búsqueda y selección de genes asociados a la senescencia de las familias *NAC* y *WRKY* en *P. hybrida***

Los FTs suelen ser nodos en las vías de señalización, capaces de integrar múltiples señales y modular el inicio y progresión de la senescencia (Podzimská-Sroka *et al.*, 2015). Varias familias de FTs, por ejemplo, *NAC*, *WRKY*, *AP2/EREBP*, proteínas dedos de zinc *C2H2*, *MYB* y *bZIP*, han mostrado estar vinculadas con la regulación de la senescencia foliar y floral (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003, 2005; Balazadeh *et al.*, 2008; Breeze *et al.*, 2011, Wagstaff *et al.*, 2009). Los miembros de estas familias representan una fracción importante de los genes que cambian su expresión a lo largo de la senescencia foliar y floral, algunos de ellos de forma temprana, lo que sugiere que este grupo de proteínas sería particularmente importante para el inicio y la progresión del proceso (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Breeze *et al.*, 2011; Balazadeh *et al.*, 2008, Wagstaff *et al.*, 2009). Es por eso que la identificación de FTs que actúen como integradores de dichas señales asociadas a la senescencia, nos pareció ser un buen punto de partida para la identificación de genes candidatos capaces de regular este proceso en petunia.

Los miembros de las familias *NAC* y *WRKY* han sido ampliamente reportados en la especie de referencia, *Arabidopsis*, con muchos de ellos actuando como genes *SAG* o como reguladores directos de la senescencia foliar (*Leaf Senescence Database*; *Arabidopsis eFP Browser*; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Christiansen *et al.*, 2011; Besseau *et al.*, 2012; Doll *et al.*, 2020). Por tal motivo es que decidimos buscar putativos ortólogos en *P. hybrida* partiendo de genes asociados a la senescencia de *Arabidopsis*. Al seleccionar aquellos miembros de las familias *NAC* y *WRKY* de *Arabidopsis* calificados como *SAGs* o *SDGs*, se encontró que pertenecen a 6 de un total de 8 subfamilias descritas para la familia *NAC* (Shen *et al.*, 2009), mientras que para la familia *WRKY*, los miembros seleccionados pertenecen a 6 de un total de 7 subfamilias (Eulgem *et al.*, 2000). Por lo tanto, no se observó una preferencia o enriquecimiento a nivel filogenético de los miembros asociados a la senescencia de ambas familias en *Arabidopsis* (Figs. 4-5 y Tablas 1-2).

Si bien se seleccionaron 41 genes *NAC* y 28 genes *WRKY* asociados a la senescencia en *Arabidopsis*, el análisis de tBLASTn identificó 29 *PhNACs* y 20 *PhWRKYs* utilizando un repositorio de secuencias de *P. hybrida* generado a partir de un transcriptoma foliar (Villarino *et al.*, 2014; González *et al.*, 2017; Tablas 1-2). Varios miembros en *Arabidopsis* tuvieron el mismo ortólogo en *P. hybrida*, por lo que la disminución en el número de genes identificados podría deberse a que los datos del ARN-seq no representan el total de genes de cada familia, sino únicamente los genes expresados en las hojas. A su vez, hasta el momento no se sabe si existe equivalencia en la cantidad total de genes de cada familia entre *Arabidopsis* y petunia. Al momento en que dichas secuencias fueron recuperadas y posteriormente cuantificados sus transcritos por qPCR, el transcriptoma foliar era la fuente más confiable y representativa de secuencias disponibles en *P.*

*hybrida* (Villarino *et al.*, 2014). Posteriormente, se liberaron al dominio público las secuencias genómicas de los parentales de *P. hybrida* (*P. axillaris* y *P. inflata*, Bombarely *et al.*, 2016), aunque los datos de ARN-seq seguían siendo la mejor opción para nuestro análisis ya que representaban genes de *P. hybrida* que se expresaban en las hojas.

El alineamiento del extremo N-terminal de las proteínas predichas de *P. hybrida*, permitió identificar al dominio NAC y a sus 5 subdominios conservados (A-E) y al dominio WRKY con sus residuos wrky acompañados de los motivos característicos de dedos de zinc (Figs. 6-7). Para la familia NAC, se hallaron aminoácidos altamente conservados en posiciones específicas que fueron descritos en otras especies como *Arabidopsis*, arroz, tomate, papa, tabaco y algodón, entre otras (Fig. 6) (Ooka *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2018; Meng *et al.*, 2009; Pereira-Santana *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2015). De la misma manera para la familia WRKY, se hallaron el/los dominio/s wrky en la región N-terminal, seguidos de los motivos de dedos de zinc en la región intermedia de la proteína, siendo ambos altamente conservados al igual que en otras especies como *Arabidopsis*, arroz, *Brachypodium distachyon*, berenjena, tomate y zanahoria, entre otras (Fig. 7) (Li *et al.*, 2016; Rushton *et al.*, 2010; Tripathi *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015). De esta manera, se determinó que las proteínas identificadas corresponden efectivamente a miembros de las familias NAC y WRKY en *P. hybrida*.

### **Análisis de expresión de genes *PhNAC* y *PhWRKY* en tres procesos de senescencia**

La transcripción tiene un rol clave tanto en la regulación de la senescencia, por lo tanto, la identificación de redes regulatorias basadas en los niveles de transcritos es un buen punto de partida para identificar potenciales reguladores de la senescencia (Breeze *et al.*, 2011). La expresión de genes *NAC* y *WRKY* en otras especies ha sido en su mayoría estudiada a través de ensayos en los que se comparan dos puntos en el tiempo de manera de evaluar cambios de expresión, por lo que es difícil definir si dichos cambios son tempranos o tardíos. Es por eso que, al comparar dichos ensayos con los resultados obtenidos en petunia, simplemente se dirá si se encuentran sobre- o sub-expresados a medida que la hoja o los pétalos avanzan en su ontogenia, sin hacer referencia al estadio del desarrollo en el que se encuentran.

De los 41 genes *NAC* seleccionados en *Arabidopsis*, una alta proporción cambia su expresión desde estadios tempranos de la senescencia foliar (Tabla 1). Además, muchos de los genes que aumentan o disminuyen su expresión en la SNH de *Arabidopsis* mantienen la misma tendencia en la SIP, mostrando posibles similitudes en la regulación de la senescencia en ambos órganos por parte de esta familia en *Arabidopsis* (Tabla 1). Los perfiles de expresión de los 23 genes *PhNAC* estadísticamente significativos, fueron consistentes y al igual que en *Arabidopsis*, la mayoría



mostró cambios de expresión desde estadios tempranos e intermedios de la senescencia foliar (Fig. 8). Además, 20 de los 23 *PhNAC* presentaron similares perfiles de expresión durante la SNH que sus respectivos equivalentes en *Arabidopsis* (Tabla 1 y Fig. 8), mientras que de los 18 *PhNAC* significativos en la SIP, 14 mostraron las mismas tendencias que sus putativos ortólogos de *Arabidopsis* (Tabla 1 y Fig. 10) (Wagstaff *et al.* 2009), indicando un alto porcentaje de semejanza en los perfiles de expresión entre ambas especies.

Por otro lado, de los 28 genes *WRKY* seleccionados en *Arabidopsis*, sólo 9 cambian su expresión en estadios tempranos de la SNH mientras que el resto lo hacen en estadios intermedios y tardíos (Tabla 2). Adicionalmente, todos los genes *WRKY* seleccionados aumentan su expresión tanto en la SNH como en la SIP de *Arabidopsis*. Los perfiles de expresión de los 17 genes *PhWRKY* estadísticamente significativos, fueron consistentes y presentaron similitudes en cuanto a la expresión durante la SNH respecto de sus putativos ortólogos de *Arabidopsis*, además, la mayoría también mostraron cambios de expresión desde estadios intermedios de la SNH (Tabla 2, Fig. 8). Sin embargo, en la SIP, los genes de petunia no presentaron cambios muy robustos e incluso algunos de ellos no fueron detectados o mostraron perfiles opuestos a los respectivos equivalentes de *Arabidopsis* (Tabla 2 y Fig. 10) (Wagstaff *et al.* 2009), indicando un alto porcentaje de semejanza en los perfiles de expresión entre ambas especies en la SNH, pero no en la SIP.

En los tipos de senescencia que ocurren en los pétalos (SNP y SIP), los *PhNAC* cambiaron su expresión en estadios en general tardíos, mostrando una divergencia con respecto a lo que ocurre en la SNH (Fig. 11). También se observó una reducción en el número de genes con expresión consistente, ya que de los 23 genes que cambiaron su expresión de manera significativa en la SNH, el número disminuyó a 19 y 18 genes en la SNP y SIP, respectivamente. La variación en los momentos de expresión podría suponer una diferencia en los mecanismos de acción de la familia *NAC* entre ambos órganos de petunia. Por otro lado, la reducción en el número de genes de la familia *NAC* con expresión consistente entre las hojas y los pétalos podría deberse a que los miembros de esta familia de FTs desarrollan un papel de regulación y transducción de señales más importante durante la senescencia de las hojas respecto de los tipos de senescencia que ocurren en los pétalos.

Por otro lado, al analizar la SNH en la familia *WRKY*, se observó que los cambios de expresión se producen en estadios más bien intermedios del proceso, mientras que en la SNP ocurrieron en etapas tempranas, suponiendo, al igual que para la familia *NAC*, mecanismos de regulación diferentes entre ambos órganos de petunia (Fig. 12). En la SIP, si bien se observan diferencias significativas, los cambios de expresión son muy bajos para la mayoría de sus miembros, a diferencia de los *PhNAC*, los cuales presentaron algunos genes con valores consistentes (Fig. 11). De esta manera, los miembros de la familia *WRKYs* estarían asociados a mecanismos regulatorios

que ocurren en la senescencia natural de ambos órganos, mientras que no parecerían estar muy involucrados en la SIP (Fig. 12). De manera similar a lo observado para los miembros de la familia NAC, se observó una reducción en el número de genes asociados a la senescencia de los pétalos en comparación con lo que ocurre en las hojas, reforzando la idea de que los genes de ambas familias de FTs desarrollarían un papel de regulación menos importante en la senescencia de los pétalos.

Es interesante notar que ambas familias alternan sus momentos preponderantes de expresión entre ambos órganos, siendo los *PhNAC* más tempranos en hojas y más bien tardíos en los pétalos, mientras que lo opuesto se observa para los *PhWRKY*. Esta diferencia temporal podría indicar que ambas familias actúan de manera secuencial, induciendo su expresión en uno u otro órgano de manera coordinada. Sin embargo, estudios de co-expresión en conjunto con análisis de las regiones promotoras de los genes sería necesarios para validar esta hipótesis.

Además de *Arabidopsis*, miembros de la familia NAC han sido reportados como genes SAG en varias especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas que incluyen arroz (Liang *et al.*, 2014), trigo (Gregersen y Holm, 2007), cebada (Christiansen y Gregersen, 2014) sorgo (Wu *et al.*, 2016), maíz (Zhang *et al.*, 2014), girasol (Moschen *et al.*, 2014) y algodón (Lin *et al.*, 2015). De manera similar, miembros de la familia WRKY han sido reportados como SAGs en hojas de *Arabidopsis*, algodón (Gu *et al.*, 2019), girasol (Moschen *et al.*, 2014), arroz (Liu *et al.*, 2016) y trigo (Zhang *et al.*, 2016), entre otros. Al igual que en *P. hybrida*, ambas familias de FTs cuentan con miembros que cambian su expresión durante la senescencia de las hojas en múltiples especies, reafirmando la idea de que se trata de familias con roles muy conservados en la regulación de la senescencia foliar.

Con respecto a la senescencia de las flores, en la planta ornamental etileno-sensible *wallflower* (*Erysimum linifolium*), los FTs más representativos que aumentaron su expresión en pétalos senescentes fueron los de las familias NAC, WRKY y bZIP (Price *et al.* 2008). Llamativamente la familia WRKY fue aquella que presentó el mayor número de miembros sobre-expresados en pétalos senescentes. Resultados similares fueron descritos asociando un mayor número de miembros WRKY a los pétalos senescentes de *Arabidopsis* (Wagstaff *et al.*, 2009). En la planta ornamental Rosa de China (*Hibiscus rosa-sinensis*), que presenta flores efímeras con una longevidad de solo 24 h, un gran número de genes NAC y WRKY aumentaron su expresión en pétalos senescentes respecto de las flores en estado de pimpollo o en antesis (Trivellini *et al.* 2016). Por otro lado, en *Morning Glory* (*Ipomoea nil*), otra especie ornamental que también presenta flores efímeras, dos miembros de la familia NAC fueron reportados de aumentar su expresión en pétalos senescentes de una variedad etileno-insensible (Shibuya *et al.*, 2014; Shinozaki *et al.*, 2014). En otra especie etileno-insensible como el Jazmín del Cabo (*Gardenia jasminoides ellis*), miembros de la familia WRKY fueron reportados de aumentar considerablemente

su expresión a medida que la flor envejece, mientras que miembros de la familia NAC no parecerían tener grandes cambios de expresión (Tsanakas *et al.*, 2014).

Las evidencias indican que los miembros de ambas familias tendrían roles importantes en la regulación de la senescencia floral en múltiples especies, aun en procesos de senescencia tan acelerados como los que ocurren en flores efímeras, aunque la acción de miembros de cada familia sería especie-dependiente. Los miembros de la familia WRKY parecerían tener un rol más importante en los tipos de senescencia que ocurren en los pétalos, evidenciado por el enriquecimiento de sus miembros en análisis transcriptómicos de pétalos senescentes (Price *et al.*, 2008, Wagstaff *et al.*, 2009).

En base a los contundentes perfiles de expresión en *P. hybrida*, ambas familias de FT parecerían tener un protagonismo central en la senescencia de ambos órganos.

### **Selección de genes candidatos asociados a la senescencia de las familias NAC y WRKY en *P. hybrida***

El análisis de *heatmap* permitió visualizar simultáneamente la expresión de los genes en los tres tipos de senescencia estudiados y de esa manera, agruparlos según su grado de participación en los mismos (Figs. 11-12). El análisis filogenético junto con la identificación de motivos en la región C-terminal de las proteínas NAC y WRKY asociadas a la senescencia permitió la identificación de grupos funcionales que comparten motivos particulares entre diferentes especies (Figs. 13-14). Se observó una buena correlación entre los motivos presentes en la región C-terminal, a pesar de su mayor divergencia, con las secuencias más conservadas presentes en la región N-terminal que contiene los dominios NAC y WRKY para cada grupo funcional, como se ha reportado en otros trabajos (Ooka *et al.*, 2003, Borrill *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2012; Zhang y Wang, 2005). Este hecho permitió plantear la existencia de similitudes en los mecanismos de regulación entre las proteínas de un mismo grupo y confirmar que los PhNAC y PhWRKY obtenidos serían los putativos ortólogos de los SAGs seleccionados de *Arabidopsis* y de otras especies. Se definieron un total de 18 grupos funcionales para la familia NAC (Fig. 13), que fueron clasificados en seis subfamilias (NAC-a a NAC-f) según Shen *et al.* (2009). Miembros con roles regulatorios reportados en la senescencia foliar estuvieron presentes en los grupos funcionales I, II, III, V, VI, VIII, X, XI, XIII, XVI y XVIII (Fig. 13). Para la familia WRKY, se definieron un total de 10 grupos funcionales, que fueron clasificados en las subfamilias I, II a-e y III, según Eulgem *et al.* (2000). Se observó que miembros con roles regulatorios reportados en la senescencia foliar estuvieron presentes en los grupos funcionales II, III, IV, V, VIII y X (Fig. 14). Estos resultados indican que proteínas NAC y WRKY estructuralmente distintas pueden participar en la regulación de la senescencia.

A partir de los datos de expresión y la pertenencia o no a un buen grupo funcional, se seleccionaron aquellos candidatos que podrían regular la senescencia en las hojas y en los pétalos de *P. hybrida* (Tabla 3). A continuación, se describe la selección de los mismos y su relación con putativos ortólogos descritos en otras especies.

El primer grupo es aquel en el que se observa expresión incrementada en los tres tipos de senescencia estudiados. Para la familia NAC, los miembros de este grupo fueron *PhNAC058*, *PhNAC101*, *PhNAC017*, *PhNAC024*, *PhNAC074*, *PhNAC089*, *PhNAC106*; mientras que para la familia WRKY fueron *PhWRKY072*, *PhWRKY015*, *PhWRKY028*, *PhWRKY006*, *PhWRKY033* y *PhWRKY063* (Tabla 3).

*PhNAC058* presentó cambios de expresión altos en ambos órganos, al igual que sus putativos ortólogos de *Arabidopsis*, *ANAC046* (AT3G04060) y *ANAC087* (AT5G18270), aunque estos presentan cambios tempranos en hojas mientras que *PhNAC058* se expresa tardíamente tanto en hojas como en pétalos (Fig. 11 y Tabla 1). *ANAC046* es un promotor de la senescencia foliar (Oda-Yamamizo *et al.*, 2016), y comparte el grupo funcional X con *PhNAC058*, aunque no presentan motivos proteicos en común (Fig. 13). *PhWRKY015*, al igual que su putativo ortólogo de *Arabidopsis* *AtWRKY015* (AT2G23320), aumentó su expresión en ambos órganos, aunque de manera tardía y muy leve en las hojas. Posee, sin embargo, expresión temprana en los pétalos, aunque moderada (Fig. 12 y Tabla 2). *PhWRKY015* pertenece al grupo funcional IV en el cual se encuentra *OsWRKY042*, un promotor de la senescencia foliar en arroz (Han *et al.*, 2014), aunque filogenéticamente se encuentran separados y hay otros miembros de la familia WRKY que muestran mayor afinidad. Además, comparte pocos de los motivos proteicos presentes en *OsWRKY042*, con lo cual no es considerado su ortólogo estricto (Fig. 14).

*PhNAC106*, *PhNAC101* y *PhWRKY028* aumentaron su expresión en los tres tipos de senescencia con una buena calificación, siendo *PhNAC106* particularmente más importante en la senescencia de los pétalos, mientras que *PhNAC101* sería más relevante en la senescencia foliar (Fig. 11). *PhWRKY028* muestra una muy buena expresión en ambos órganos (Fig. 12). Estos genes pertenecen a grupos funcionales distintos dentro de cada familia (I, IV y IX, respectivamente) en los cuales no se encuentran miembros con función reportada en la regulación de la senescencia (Figs. 13-14). Los putativos ortólogos de *PhNAC101* en *Arabidopsis*, *ANAC055* (AT3G1500), *ANAC019* (AT1G52890) y *ANAC072* (AT4G27410), incrementan su expresión desde estadios tempranos de la SNH (Fig. 11 y Tabla 1), y si bien fueron reportados en diferentes respuestas asociadas al estrés abiótico, no poseen una función reportada en senescencia (Hickman *et al.*, 2013). *PhNAC106* sería un caso ambiguo, ya que, si bien comparte el grupo funcional I con *VNI2* de *Arabidopsis*, este no pertenece estrictamente al mismo grupo filogenético del árbol (Fig. 13 y Tabla 3). *VNI2* aumenta su expresión tanto en hojas como en pétalos y regula negativamente la senescencia foliar en

Arabidopsis, además de integrar el estrés abiótico con la senescencia foliar (Yang *et al.*, 2011). En base a estas observaciones, PhNAC106 podría regular negativamente la senescencia en petunia. El putativo ortólogo de *PhWRKY028* en Arabidopsis *AtWRKY028* (AT4G18170), aumenta su expresión en estadios intermedios de la SNH y en la SIP, aunque no posee función reportada (Fig. 14 y Tabla 2).

En base a lo expuesto, los genes *PhNAC058*, *PhNAC106*, *PhNAC101*, *PhWRKY015* y *PhWRKY028* fueron descartados como candidatos fuertes para futuros análisis de funcionalidad en senescencia ya que carecían de una buena clasificación en sus niveles de expresión o no presentaban putativos ortólogos con función reportada en sus respectivos grupos funcionales (Figs. 13-14 y Tabla 3). Sin embargo, *PhNAC106*, *PhNAC101* y *PhWRKY028* presentaron una buena expresión en ambos órganos por lo que deberán ser tenidos en cuenta en futuros experimentos como genes tal vez más específicos de la familia Solanaceae.

*PhNAC089* presentó un considerable aumento de expresión en ambos órganos al igual que su putativo ortólogo de Arabidopsis *ANAC104* (AT5G64530) (Fig. 11 y Tabla 1). Este miembro es uno de los pocos genes *PhNAC* que cambió su expresión en estadios tempranos de la SIP, mientras que en la SNH y la SNP lo hizo de forma intermedia y tardía, respectivamente (Fig. 11). Sus putativos ortólogos de arroz (*OsNAC106*) y cebada (*HvNAC026*), con los que comparte el grupo funcional II, aumentan su expresión durante la senescencia foliar, siendo *OsNAC106* un regulador negativo en hojas de arroz (Sakuraba *et al.*, 2015), indicando que *PhNAC089* podría regular negativamente la senescencia foliar y/o floral en petunia; aunque hay que tener en cuenta que sus putativos ortólogos son miembros de las monocotiledóneas (Fig. 13) y no presentan motivos proteicos definidos en el extremo C-terminal.

Los genes *PhNAC017* y *PhNAC074* mostraron cambios contundentes y tempranos de expresión en la SNH, aunque, a diferencia de *PhNAC017*, *PhNAC074* no mostró cambios tan marcados en la SNP y SIP (Fig. 11).

*PhNAC017*, es el putativo ortólogo de *ORE1/ORS1*, *SIORE1S02* y *GhNAC12*, los cuales aumentan su expresión en hojas de Arabidopsis, tomate y algodón, respectivamente. *ORE1/ORS1* y *SIORE1S02* promueven la SNH en Arabidopsis y tomate (Kim *et al.*, 2009; Balazadeh *et al.*, 2011; Lira *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2016) (Tabla 3). *ORE1* aumenta durante la SNH y su expresión se encuentra regulada por la acción del microARN *miR164* de una manera dependiente del etileno. Cuando esta hormona aumenta gradualmente con la edad de la hoja, los niveles del *miR164* disminuyen permitiendo la acumulación de transcritos de *ORE1* (Kim *et al.*, 2009). El grupo de trabajo ha reportado la expresión de varios genes de la familia *NAC* durante la senescencia foliar en girasol y ha caracterizado un tipo de regulación similar con un putativo ortólogo de *ORE1* en girasol, *HaNAC01*, reflejando mecanismos conservados entre especies (Moschen *et al.*, 2014). Otro

miembro del grupo funcional es InEPH1 de *Ipomoea nil*, un putativo ortólogo de ORE1/ORS1, el cual promueve la senescencia en pétalos y representa hasta el momento al único NAC con un rol reportado en la senescencia de estos órganos (Tabla 3) (Shibuya *et al.*, 2014). Sin embargo, InEPH1 no presenta un rol claro en la senescencia foliar como sus putativos ortólogos de *Arabidopsis*, por lo que proteínas NAC similares podrían regular de diferente manera la senescencia que ocurre en los distintos órganos según cada especie. Todos los miembros del grupo funcional XI poseen el motivo proteico M16 en su región C-terminal. En base al gran número de ortólogos con función descrita, y por poseer en su grupo funcional al único miembro de la familia NAC reportado de promover la senescencia en los pétalos (InEPH1) (Fig. 13) compartiendo el motivo conservado M16, PhNAC017 fue considerado un candidato fuerte a regular la senescencia en *P. hybrida*.

PhNAC074 del grupo funcional VIII es el putativo ortólogo de ANAC021 (AT1G56010) de *Arabidopsis*, y del regulador negativo de la senescencia foliar en trigo, TaNAC-S (Zhao *et al.*, 2015) (Fig. 13). ANAC021 y PhNAC074, de manera similar a PhNAC017 y al resto de los miembros del grupo funcional XI poseen el motivo M16 en la región C-terminal. Los putativos ortólogos de *PhNAC017* incrementan su expresión y regulan positivamente la senescencia en diferentes especies como se describió previamente, mientras que *TaNAC-S* no posee el motivo M16, disminuye su expresión y regula negativamente la senescencia foliar en trigo (Zhao *et al.*, 2015). La función negativa en senescencia de *TaNAC-S* podría ser explicada por la ausencia del motivo M16. En diferentes especies de dicotiledóneas, este motivo está presente en reguladores positivos del grupo XI. Por lo tanto, el motivo M16 presente en PhNAC074 podría conferirle la capacidad de regular positivamente la senescencia en petunia. Además, estas evidencias sugieren que las proteínas asociadas a este motivo (grupos funcionales VIII y XI) podrían tener una regulación divergente entre monocotiledóneas y dicotiledóneas.

*PhNAC024* es el miembro de la familia NAC con los mejores perfiles de expresión en los tres tipos de senescencia estudiados (Fig. 11). Sus putativos ortólogos del grupo funcional III aumentan su expresión en hojas de *Arabidopsis*, arroz, algodón, cebada, soja, tomate, girasol, vid y trigo; y regulan positivamente la senescencia foliar tanto en dicotiledóneas como monocotiledóneas, incluyendo *Arabidopsis*, arroz, algodón, cebada, trigo, soja y tomate, aunque no poseen motivos proteicos detectados en el extremo C-terminal (Fig. 13) (Guo y Gan, 2006; Zhou *et al.*, 2013; Uauy *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2015; Christiansen *et al.*, 2016; Pinheiro *et al.*, 2009; Moschen *et al.*, 2014; Hénanff *et al.*, 2013). Muchos de estos miembros regulan la senescencia a través de vías de señalización vinculadas al ABA (Guo y Gan, 2006; Liang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2018). A su vez, AtNAP está asociado a la vía de señalización del etileno, promoviendo la senescencia en *Arabidopsis*, lo cual sugiere que las vías hormonales del ABA y el etileno se encuentran interconectadas en la regulación de la senescencia foliar (Kim *et al.*,

2014). Considerando que los cambios de expresión fueron muy fuertes en ambos órganos, y sumado a la gran cantidad de putativos ortólogos con función reportada en senescencia en diferentes especies, PhNAC024 es uno de los candidatos más interesantes identificados en este trabajo.

*PhWRKY033* pertenece al grupo filogenético X, y al igual que su putativo ortólogo de *Arabidopsis* *AtWRKY033* (AT2G38470), aumentó su expresión de forma muy contundente en estadios intermedios de la SNH, mientras que los cambios fueron moderados en la SNP y SIP (Fig. 12 y Tabla 2). *PhWRKY033* comparte su grupo funcional, así como la gran mayoría de sus motivos proteicos de la región C-terminal, con su putativo ortólogo de trigo, *TaWRKY007*, que fue reportado como un promotor de la senescencia al ser sobre-expresado de manera ectópica en hojas de *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2016). Estas evidencias sugieren que sería un buen gen candidato a regular la senescencia en petunia.

*PhWRKY072* y *PhWRKY006* pertenecen al grupo funcional V (Fig. 14). *PhWRKY006* presentó expresión intermedia en la SNH, y tardía e intermedia en la SNP y SIP, respectivamente, con cambios de expresión moderados en los pétalos. Por otro lado, *PhWRKY072* presentó expresión temprana en los tres tipos de senescencia estudiados, y sus cambios fueron muy buenos tanto en la SNH como en la SNP (Fig. 12). Ambos genes de petunia comparten el grupo funcional con *AtWRKY006* (AT1G62300), el cual aumenta su expresión en hojas y en pétalos de *Arabidopsis* (Fig. 14 y Tablas 2-3). *AtWRKY006* es un promotor de la senescencia foliar que se une directamente a los promotores de genes *SAG*. Si bien líneas mutantes de pérdida de función de *atwrky006* no presentan fenotipo de senescencia retrasada, este hecho posiblemente sea debido a la existencia de redundancia funcional con otros miembros de la familia (Robatzek *et al.*, 2001; Robatzek y Somssich, 2002). Ambos miembros de petunia mostraron la misma distribución de motivos proteicos, compartiendo casi la totalidad de ellos con su putativo ortólogo de *Arabidopsis*, lo que podría sugerir la existencia de redundancia funcional (Fig. 14). Sin embargo, *PhWRKY072* mostró mejores perfiles de expresión que *PhWRKY006* y está filogenéticamente más emparentado con *AtWRKY006*, por lo que sería un candidato más interesante para evaluar a futuro su posible función en senescencia.

Otro miembro de la familia WRKY que aumentó su expresión en los tres tipos de senescencia estudiados fue *PhWRKY063*, quien pertenece al grupo funcional II conformado por los miembros *AtWRKY054* (AT2G40750) y *AtWRKY070* (AT3G56400). Al igual que sus putativos ortólogos de *Arabidopsis*, *PhWRKY063* aumentó su expresión en ambos órganos, aunque con cambios relativamente leves y en momentos intermedio/tardíos (Fig. 12 y Tabla 2). Sus putativos ortólogos de *Arabidopsis* son estructuralmente similares, presentan perfiles de expresión equivalentes en hojas y han sido reportados como reguladores negativos de la senescencia foliar, al parecer

cooperando de manera parcialmente redundante, ya que el fenotipo de senescencia acelerada se observa únicamente cuando ambos genes se encuentran mutados (Besseau *et al.*, 2012) (Fig. 14 y Tabla 3). El hecho de una posible redundancia entre ambos miembros de Arabidopsis es interesante ya que el grupo funcional II, en el cual se encuentra PhWRKY063, está integrado por otros dos miembros de petunia, PhWRKY054 y PhWRKY070, los cuales presentaron perfiles de expresión en hojas y pétalos muy similares a los de *PhWRKY063*, con la salvedad de que *PhWRKY054* no fue detectado en pétalos (Figs. 12 y 14). Otros autores han descrito la existencia de redundancia funcional entre miembros de la familia WRKY (Robatzek y Somssich, 2002; Xu *et al.*, 2006), por lo que al integrar el grupo funcional con los putativos ortólogos de Arabidopsis descritos, y teniendo todos sus miembros los mismos motivos proteicos, podríamos inferir la posibilidad de redundancia funcional entre los tres miembros de petunia que componen al grupo funcional II. Esta posibilidad sumada a los perfiles de expresión moderados, hacen de los tres *PhWRKY* genes interesantes para futuros estudios.

El segundo grupo fue definido por aquellos genes de ambas familias que aumentaron su expresión en los tipos de senescencia natural que ocurren en hojas y en pétalos (SNH y SNP; Figs. 13-14). Estos fueron *PhNAC097*, *PhNAC099*, *PhNAC095* y *PhNAC033* de la familia NAC, mientras que para la familia WRKY fueron *PhWRKY075*, *PhWRKY070*, *PhWRKY024*, *PhWRKY053*, *PhWRKY055* y *PhWRKY030* (Tabla 3).

*PhNAC097* pertenece al grupo funcional V donde sus respectivos ortólogos aumentan su expresión en hojas de Arabidopsis, *AtATAF1* (AT1G01720) (Garapati *et al.*, 2015), y de arroz, *OsNAC5* (Sperotto *et al.*, 2009) (Fig. 14 y Tabla 3). *AtATAF1* es un promotor de la senescencia foliar que aumenta su expresión en estadios tempranos de la misma, mientras que no es detectado durante la SIP de Arabidopsis, al igual que *PhNAC097* (Fig. 11 y Tabla 1). El cambio de expresión de *PhNAC097* fue tardío y su magnitud fue baja, a diferencia de la expresión reportada de *AtATAF1* (Garapati *et al.*, 2015 y Tabla 1). Todos los miembros del grupo funcional V comparten el motivo M20 en su región C-terminal, con la excepción de *OsNAC5* de arroz (Fig. 11 y 13). Este motivo parece ser exclusivo de aquellos genes que serían ortólogos de *AtATAF1*, y en particular asociado a dicotiledóneas (Fig. 11). Si bien *AtATAF1* ha sido ampliamente reportado como regulador de la senescencia foliar (Kim *et al.*, 2016), los perfiles de expresión de *PhNAC097* no fueron buenos como para ser tenido en cuenta para futuros experimentos de estudio de función en petunia.

*PhNAC033* pertenece al grupo funcional IV, el cual es próximo al grupo del previamente descrito, *AtATAF1*. Al igual que su putativo ortólogo de Arabidopsis, *ANAC102* (AT5G63790), *PhNAC033* mostró expresión temprana y moderada en la SNH, y tardía en la SNP. Sin embargo, *ANAC102* aumenta en la SIP (Fig. 11 y Tabla 1). Si bien se encuentran cercanos al grupo de *AtATAF1*, los miembros del grupo funcional IV carecen del motivo M20 descrito anteriormente (Fig. 13). Por otro



lado, los genes *PhNAC099* y *PhNAC095*, aumentaron su expresión en los tres tipos de senescencia, aunque en la SIP sus niveles fueron prácticamente despreciables. Por tal motivo, ambos fueron incluidos dentro del grupo de senescencia natural de ambos órganos (Fig. 11). Sus momentos de cambio de expresión en hojas y pétalos fueron intermedio/tardíos y pertenecen a los grupos funcionales XIV y XVII. Sus putativos ortólogos de Arabidopsis, *ANAC089* (AT5G22290) y *ANAC051* (AT3G10490), aumentan su expresión en las hojas desde estadios tempranos, con participación en la SIP únicamente de *ANAC051* ya que *ANAC089* no fue detectado en este tipo de senescencia (Fig. 11 y Tabla 1). Los niveles de expresión regulares de *PhNAC033* y *PhNAC095*, así como la falta de putativos ortólogos reportados con función en senescencia de *PhNAC033*, *PhNAC095* y *PhNAC099*, hacen que todos estos miembros no sean considerados para evaluar su función en senescencia.

*PhWRKY075* es uno de los genes más interesantes por sus consistentes cambios de expresión en ambos procesos (Fig. 12). Su putativo ortólogo de Arabidopsis con el cual comparte el grupo VIII, *AtWRKY075* (AT5G13080), aumenta su expresión en la SNH en estadios intermedios y en la SIP, aunque *PhWRKY075* lo hizo en estadios tardíos de la SNH e intermedios de la SNP, y no fue detectado en la SIP (Fig. 12 y Tabla 2). *AtWRKY075* fue reportado de promover la SNH en Arabidopsis (Li *et al.*, 2012), y teniendo en cuenta que comparte los mismos motivos proteicos que *PhWRKY075* en su región C-terminal, este es considerado un muy buen candidato para estudios de función en senescencia.

Por otro lado, *PhWRKY053*, *PhWRKY055* y *PhWRKY030* pertenecen al grupo funcional III (Fig. 14). *PhWRKY030* presentó los perfiles de expresión más interesantes de los tres genes, aumentando de forma moderada en etapas intermedias de la SNH, pero de forma temprana y muy fuerte en la SNP (Fig. 12). Su putativo ortólogo de Arabidopsis, *AtWRKY030* (AT5G24110), de manera similar presenta un aumento de expresión en estadios intermedios de la senescencia en las hojas, aunque a diferencia de *PhWRKY030*, aumenta su expresión en la SIP de Arabidopsis (Fig. 12 y Tabla 2). *AtWRKY030* ha sido reportado de participar en la regulación de la senescencia foliar, aunque no de forma directa, sino mediante la interacción con otros reguladores negativos como *AtWRKY070*, *AtWRKY054* o positivos como *AtWRKY053*. Además, líneas de ARNi para *AtWRKY030* no presentan un fenotipo diferencial en cuanto a la senescencia foliar, reforzando la idea de que este miembro participaría de forma indirecta en la senescencia mediante su asociación con los otros miembros de la familia (Besseau *et al.*, 2012). *PhWRKY030* presenta motivos proteicos en su región C-terminal muy similares a las de su putativo ortólogo en Arabidopsis, dando la posibilidad de tener una función similar, quizá mediante la interacción con otros miembros del grupo funcional III como *PhWRKY053* y *PhWRKY055*, tal a como ha sido reportado en Arabidopsis, lo que lo hace un candidato interesante para futuros ensayos (Besseau *et al.*, 2012).

Por otro lado, *PhWRKY053* y *PhWRKY055*, mostraron cambios de expresión regulares durante la SNH, siendo tardíos y tempranos, respectivamente, mientras que en la SNP los cambios fueron moderados y tempranos, respectivamente (Fig. 12). Ambos miembros pertenecen al grupo funcional de *AtWRKY053* (AT4G23810), quien aumenta su expresión en la SNH y en la SIP de *Arabidopsis*, mostrando una diferencia de regulación con *PhWRKY053*, quien disminuye en la SIP y con *PhWRKY055* que no fue detectado en este tipo de senescencia (Fig. 12 y Tabla 2). *AtWRKY053* promueve la senescencia en hojas de *Arabidopsis* activando múltiples genes *SAG* como *SAG12*, *SAG101*, *CATALASE1/2/3* y *ORE9*, entre otros (Miao *et al.*, 2004). *PhWRKY053* y *PhWRKY055* presentan casi la totalidad de los motivos proteicos presentes en la región C-terminal de *AtWRKY053*, con lo que se podría inferir una función similar en los mecanismos de regulación (Fig. 14), aunque si nos basamos en los perfiles de expresión, se esperaría una participación mayor en lo que respecta a la SNP de petunia. Teniendo en cuenta que ambos genes presentaron perfiles de expresión y motivos proteicos similares, es de esperar la existencia de cierto grado de redundancia funcional. Si bien estos genes son interesantes, los mismos no fueron tenidos en cuenta para futuros ensayos de función en senescencia debido a su expresión regular durante la SNH (Fig. 12 y Fig. 14).

*PhWRKY024* pertenece al grupo funcional X, en el cual se encuentra el ya mencionado promotor de la SNH, *TaWRKY007* (Fig. 14). Si bien filogenéticamente *PhWRKY024* no sería el ortólogo estricto de *TaWRKY007*, comparte la totalidad de los motivos proteicos en el C-terminal (Fig. 14). Sus putativos ortólogos de *Arabidopsis*, *AtWRKY026* (AT5G07100) y *AtWRKY034* (AT4G26440), aumentan su expresión en estadios temprano/intermedios de la SNH al igual que *PhWRKY024*, aunque aumentan también en la SIP en donde *PhWRKY024* presentó un perfil errático (Fig. 12 y Tabla 2). Si bien los motivos proteicos de *PhWRKY024* son similares a los del *TaWRKY007*, los perfiles de expresión de *PhWRKY024* fueron moderados en ambos órganos, por lo que no fue considerado un candidato fuerte para futuros ensayos de evaluación de función en senescencia.

El último miembro es *PhWRKY070*, perteneciente al grupo funcional II, en el cual se encuentran los ya mencionados reguladores negativos de la SNH en *Arabidopsis* *AtWRKY070* y *AtWRKY054*, con los cuales comparte los mismos motivos en su región C-terminal (Fig. 14). Sus cambios de expresión fueron intermedios en la SNH y tardíos en la SNP, y moderados en ambos casos (Fig. 12). En la SIP, su perfil fue más errático (Fig. 12). En base a lo expuesto, *PhWRKY070* no parece ser un buen candidato a tener en cuenta para estudios de función en senescencia.

El tercer grupo, está conformado por miembros de la familia NAC que disminuyeron su expresión en los tres tipos de senescencia: *PhNAC052*, *PhNAC053* y *PhNAC004* (Tabla 3).

*PhNAC052* y *PhNAC053* pertenecen al grupo VII, y disminuyeron su expresión en estadios intermedios y tardíos en los tres procesos de senescencia (Fig. 11). Sus putativos ortólogos de *Arabidopsis*, *VND7* (AT1G71930) para *PhNAC052* y *VND4* (AT1G12260) y *VND5* (AT1G62700) para *PhNAC053*, pertenecen a la subfamilia NAC-c y al igual que sus putativos ortólogos en petunia disminuyen su expresión en ambos órganos en *Arabidopsis* (Tabla 1 y Fig. 13). Si bien ambos genes evidenciaron perfiles de expresión muy parecidos, *PhNAC052* se expresó de manera más temprana y alcanzó valores mínimos más pronunciados que *PhNAC053* (Fig. 11). La región C-terminal de todos los miembros del grupo funcional VII presentaron los mismos motivos proteicos, aunque la ausencia de estos en *PhNAC053* probablemente se deba a que la secuencia recuperada sea parcial (P) (Tabla 1). Dada la alta correlación de motivos proteicos en los grupos funcionales encontrados a lo largo del análisis, podemos suponer que *PhNAC053* tendría dichos motivos (Tabla 1 y Fig. 13). En base a lo expuesto, podemos inferir que ambos genes podrían tener un rol similar y/o redundante en la regulación de la senescencia. Sin embargo, no se encontraron miembros con función reportada en senescencia en este grupo funcional (Fig. 13 y Tabla 3).

El otro miembro de este grupo, *PhNAC004*, único miembro de la familia NAC-e, es considerado el más interesante dado que disminuyó su expresión desde estadios más tempranos respecto de *PhNAC052* y *PhNAC053*, y además es el único que presenta putativos ortólogos con función reportada en su grupo funcional (VI) (Fig. 11 y 13). Sin embargo, sus putativos ortólogos, *JUB1* y *GmNAC81*, se encuentran sobre-expresados en hojas de *Arabidopsis* y soja, respectivamente, y presentan roles opuestos en la regulación de la senescencia (Tabla 3). *JUB1* es un represor de la senescencia foliar mediante la inhibición de la generación de estrés oxidativo, mientras que *GmNAC81* actúa como promotor de la senescencia, posiblemente integrando el estrés osmótico y la senescencia foliar (Wu *et al.*, 2012; Pimenta *et al.*, 2016). Las funciones contrastantes de *JUB1* y *GmNAC81*, en conjunto con sus perfiles de expresión opuestos respecto del observado en *PhNAC004*, indican que los miembros de la subfamilia NAC-e podrían tener una regulación transcripcional y/o funcional más diversa en la senescencia según las diferentes especies. Lamentablemente, no se encontraron motivos proteicos en su región C-terminal como para poder comparar e inferir algún tipo de regulación (Fig. 13). En resumen, *PhNAC052*, *PhNAC053* y *PhNAC004* son candidatos interesantes para estudiar su funcionalidad en distintos tipos de senescencia en *P. hybrida*, aunque por falta de putativos ortólogos con función reportada para *PhNAC052* y *PhNAC053*, únicamente se seleccionó como candidato fuerte a *PhNAC004*.

Por último, se encuentra el grupo con miembros de ambas familias que presentaron expresión relevante únicamente en la SNH (Tabla 3).

*PhNAC085* y *PhNAC051* pertenecen al grupo funcional IX junto con TaNAC-S, aunque filogenéticamente se encuentran alejados, y no comparten el motivo M16 descrito anteriormente

(Fig. 13). Estos genes, al igual que el putativo ortólogo de Arabidopsis *ANAC074* (AT4G28530), presentaron buenos perfiles de expresión en hojas, pero al no presentar cambios de expresión considerables en los pétalos no fueron considerados para futuros ensayos (Fig. 11 y Tabla 1).

*PhNAC082* del grupo funcional VII presentó un buen perfil de expresión en SNH, mientras que *PhNAC094* y *PhWRKY069*, pertenecientes a los grupos XV y I respectivamente, presentaron perfiles regulares en la SNH (Figs. 11-12). Ninguno de estos genes fue tenido en cuenta por su falta de expresión considerable en pétalos y por no presentar putativos ortólogos con función reportada en sus grupos (Figs. 13-14).

Por otro lado, los genes *PhNAC023*, *PhNAC096* y *PhNAC105*, pertenecientes a los grupos XIII, XVIII y XVI, respectivamente, presentan putativos ortólogos en Arabidopsis con función reportada de promover la SNH (*AtNTL9*, *AtNTL4* y *AtNAC016*, respectivamente). Sin embargo, la expresión regular mostrada durante la SNH y la falta de cambios de expresión considerables en los pétalos, no fueron tenidos en cuenta para futuros ensayos de función en senescencia (Fig. 11 y 13).

El último miembro de este grupo, *PhWRKY054*, comparte el grupo funcional II con los reguladores negativos de la SNH de Arabidopsis, *AtWRKY054* y *AtWRKY070*, ya mencionados anteriormente (Fig. 14). Este miembro de la familia WRKY presentó un muy buen perfil de expresión en hojas, aunque no fue detectado en los pétalos (Fig. 12). *PhWRKY054* resulta interesante desde el punto de vista regulatorio de la SNH, ya que comparte el grupo funcional con otros miembros de petunia descritos previamente (*PhWRKY70* y *PhWRKY063*) con los cuales podría cooperar de manera redundante. Sin embargo, la posibilidad de redundancia, así como la ausencia de expresión en pétalos, no lo hacen un buen candidato para ensayos inmediatos de estudio de función.

En resumen el análisis descripto nos permitió seleccionar 8 candidatos fuertes de la familia NAC en *P. hybrida* (*PhNAC024*, *PhNAC017*, *PhNAC004*, *PhNAC106*, *PhNAC074*, *PhNAC089*, *PhNAC101* y *PhNAC099*) y 9 candidatos de la familia WRKY (*PhWRKY033*, *PhWRKY072*, *PhWRKY006*, *PhWRKY063*, *PhWRKY028*, *PhWRKY075*, *PhWRKY070*, *PhWRKY024* y *PhWRKY030*) que podrían regular la senescencia foliar y floral debido a la magnitud y momentos tempranos e intermedios en que los cambios de expresión se producen en los distintos tipos de senescencia. Además, los genes *PhNAC024*, *PhNAC017*, *PhNAC004*, *PhNAC074* y *PhNAC089* de la familia NAC y los genes *PhWRKY033*, *PhWRKY072*, *PhWRKY006*, *PhWRKY063*, *PhWRKY075* y *PhWRKY030* de la familia WRKY presentaron putativos ortólogos con función reportada en la regulación de la senescencia en Arabidopsis y/o en otras especies, compartiendo, en general, los mismos motivos proteicos de sus putativos ortólogos, lo cual aumenta la probabilidad de que cumplan un rol similar (Borrill *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2015). Aunque *PhNAC106*, *PhNAC099*, *PhNAC101*, *PhWRKY028*, *PhWRKY070* y *PhWRKY024* no poseen putativos ortólogos asociados a

la senescencia, estos mostraron buenos cambios de expresión desde estadios tempranos e intermedios en hojas y/o flores, con lo cual son considerados de gran relevancia para futuros ensayos de función en senescencia.

Si bien muchos de los genes mencionados anteriormente son buenos candidatos, se decidió continuar con los análisis funcionales de los mejores candidatos de la familia NAC, *PhNAC024* y *PhNAC017*. La familia NAC presenta miembros reportados de regular la senescencia foliar en un mayor número de especies respecto de aquellos de la familia WRKY. Además, un miembro de la familia NAC, putativo ortólogo de *PhNAC017*, fue reportado de regular la senescencia en los pétalos de *Ipomoea nil* (Shibuya *et al.*, 2014), mientras que no existen evidencias hasta el momento de genes de la familia WRKY que regulen la senescencia de los pétalos.

A continuación, se discuten los ensayos de estudio de función en la senescencia de hojas y pétalos de *PhNAC024* y *PhNAC017*, mediante la generación de líneas de sobre-expresión y de silenciamiento génico por ARNi en *P. hybrida*.

### **PhNAC024 y su rol como regulador de la senescencia foliar en *P. hybrida***

Como se mencionó previamente, los experimentos descritos en los capítulos 1, 2 y 3 fueron realizados con el cultivar comercial *P. hybrida* cv. 'Ultra White' el cual fue fácilmente obtenido en el mercado. Sin embargo, los ensayos posteriores de estudio de función en senescencia requerían de la transformación de plantas de petunia (Capítulo 4), los cuales se realizaron con el cultivar 'Mitchell Diploid' gentilmente enviado desde Francia por el Dr. Michiel Vandenbussche. Este punto es importante, ya que las construcciones de silenciamiento génico se realizaron a partir de secuencias del transcriptoma foliar de Villarino *et al.* (2014) utilizando dicho cultivar.

*AtNAP* ha sido ampliamente reportado como un regulador central de la senescencia foliar mediada por ABA en *Arabidopsis* (Guo y Gan, 2006; Zhang y Gan, 2012). Mutantes *atnap* muestran un retraso importante de la senescencia foliar, y plantas sobre-expresantes de *AtNAP* muestran senescencia acelerada en *Arabidopsis* regulando la expresión de genes *SAG* en vías de señalización mediadas por ABA (Yang *et al.*, 2014b). Muchos trabajos se han reportado demostrando la importancia de *AtNAP* y de sus respectivos ortólogos en monocotiledóneas (arroz, trigo, cebada) y dicotiledóneas (soja, tomate, algodón) como genes reguladores centrales de la senescencia (Luoni *et al.*, 2019).

Al realizar la búsqueda en *P. hybrida* del putativo ortólogo de *AtNAP*, *PhNAC024* se mostró como el mejor candidato por sus altos valores de identidad (86%), despejando la posibilidad de que exista otro posible ortólogo en petunia (Anexo 1). Si bien la cobertura mostrada en dicha tabla no es muy

buena, esto se debe principalmente a que la secuencia recuperada del transcriptoma foliar de *P. hybrida* se encontraba incompleta o parcial (P), y fue luego completada con la región faltante, presente en otra secuencia del mismo transcriptoma. La proteína completa de PhNAC024 obtuvo los mismos resultados que la secuencia de AtNAP al realizar un BLASTp contra los genomas de los parentales de *P. hybrida*, confirmando que la secuencia de PhNAC024 era efectivamente el ortólogo de AtNAP (Anexo 1). Valores similares manteniendo altos porcentajes de identidad, aunque reportados solo para la región NAC conservada, se observaron en putativos ortólogos de AtNAP como GhNAP de algodón (91%), OsNAP de arroz (61%), y SINAP2 en tomate (91%), todos ellos reguladores reportados de la senescencia en estas especies (Fan *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2013, Ma *et al.*, 2018).

Con el objetivo de caracterizar el rol de PhNAC024 en la senescencia foliar de petunia, se analizó la progresión de la SNH en líneas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento génico (Fig. 17). Ambas líneas sobre-expresantes de *PhNAC024* presentaron longevidad reducida en sus hojas, mientras que las líneas de silenciamiento presentaron longevidad aumentada respecto de plantas control (Fig. 17). La longevidad en las hojas se correlaciona con los niveles de abundancia de *PhNAC024* en las distintas líneas transgénicas independientes utilizadas (Fig. 18), así como los diferentes niveles de amarillamiento entre las líneas observados en el último punto de muestreo (Fig. 17). Estos resultados son consistentes con los niveles de sobre-expresión y silenciamiento de putativos ortólogos de PhNAC024 en otras especies como mijo (*Setaria italica* L., sobre-expresión de *SiNAC1* en Arabidopsis) (Ren *et al.*, 2018), algodón (Fan *et al.*, 2015) Arabidopsis (Guo y Gan 2006), cebada (Christiansen *et al.* 2016), tomate (Ma *et al.* 2018) y arroz (Liang *et al.*, 2013). Sin embargo, es notorio como la disminución de *PhNAC024* recién en las etapas tardías de la senescencia foliar, observado en la línea RNAi-26, pareció ser suficiente como para prolongar la longevidad de las hojas (Fig. 17 y 18).

Durante el crecimiento de las plantas, no se observaron diferencias morfológicas en las líneas transgénicas en comparación con la línea control (Figura 19). Los resultados indican que PhNAC024 no alteraría otros aspectos del desarrollo que no estén asociados a la senescencia foliar en petunia, de manera similar a como ha sido reportado en algodón (Fan *et al.*, 2015), Arabidopsis (Guo y Gan, 2006), tomate (Ma *et al.*, 2018) y arroz (Liang *et al.*, 2013), aunque en cebada, la sobre-expresión del putativo ortólogo *HvNAC005* provoca el desarrollo de plantas enanas y espigas de menor tamaño (Christiansen *et al.*, 2016). Por lo tanto, dependiendo de las especies, la sobre-expresión podría alterar otros aspectos del desarrollo no asociados a la senescencia. Lamentablemente, *HvNAC005* no fue incluido en el árbol filogenético (Fig. 13) por lo que no se pudo asociar el fenotipo aberrante en las plantas de cebada con algún motivo proteico presente en su región C-terminal.

El avance de la senescencia foliar se caracteriza por la degradación de la clorofila, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, entre otros, mediante la acción de genes *SAG* que intervienen en la degradación de estas macromoléculas y la removilización de los constituyentes generados a otras regiones de la planta. La cuantificación del contenido de clorofila total y proteínas solubles, en conjunto con el análisis de expresión de genes marcadores de senescencia (*PhCAB2* y *PhSAG12*), nos permitieron confirmar que la alteración en la longevidad de las hojas en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento de *PhNAC024*, se debe efectivamente a una alteración en los momentos de inicio y progresión de la senescencia (Fig. 20). Los niveles de clorofila en las líneas sobre-expresantes disminuyeron significativamente recién a los días 30 y 41, al igual que la abundancia de *PhCAB2*, aunque dichos valores no fueron significativos (Fig. 20A y C), mientras que los niveles de proteínas solubles, así como la abundancia de *PhSAG12* se encontraron disminuidos y aumentados significativamente desde estadios más tempranos (día 14), respectivamente (Fig. 20B y F). En contraparte, los valores de los mismos marcadores del proceso se comportaron de forma similar a la línea control en los primeros estadios en las líneas de silenciamiento de *PhNAC024*, y se diferenciaron recién en los estadios más tardíos (día 72), siendo opuestos a las tendencias mostradas por las líneas de sobre-expresión de *PhNAC024* (Fig. 20).

La expresión prematura de *PhNAC024* en las líneas sobre-expresantes aceleró el inicio del proceso, mientras que la ausencia de *PhNAC024* en etapas iniciales, en la línea RNAi-38, no pareció tener un efecto concreto, tal vez porque los niveles de *PhNAC024* en la línea control no son normalmente muy elevados en estos estadios. Por el contrario, en etapas tardías la disminución de *PhNAC024* muestra un efecto apreciable al retrasar en gran medida la senescencia foliar de forma dependiente del grado de silenciamiento, ya que en algunos parámetros la línea RNAi-38 mostró diferencias significativas respecto de la línea control, mientras que la línea RNAi-26 tuvo tendencia similar a la línea RNAi-38 pero sin llegar a ser estadísticamente significativa respecto del línea control (Fig. 20). En hojas de *Arabidopsis*, algodón y tomate, la abundancia de transcriptos de los putativos ortólogos de *PhNAC024* aumenta significativamente en hojas senescentes, lo que podría estar indicando que la función promotora de la senescencia de *PhNAC024* se produce cuando las hojas adquieren un cierto nivel de madurez fisiológica o cierto nivel de acumulación de ARCs (Guo y Gan, 2006; Ma *et al.* 2018; Fan *et al.*, 2015).

Para estudiar si la regulación de la senescencia foliar mediada por *PhNAC024* ocurre, al menos en parte, por alteraciones en la expresión de genes que regulan la senescencia foliar en otras especies, se evaluó la expresión de genes *SAG* asociados a la degradación de los cloroplastos (*PhSGR1* y *PhPAO*) y de otros como *PhSAG113* involucrado en la vía de señalización de la senescencia mediada por ABA, y la nucleasa *PhBFN1* (Fig. 20). Todos los genes siguieron, con algunas leves diferencias, un patrón similar al del gen marcador de senescencia *PhSAG12*, con incrementos de expresión desde etapas tempranas, especialmente *PhSGR1* y *PhBFN1*, en las

líneas sobre-expresantes y disminuidos marcadamente en las etapas tardías desde el día 41 en adelante en las líneas de silenciamiento génico (Fig. 20). En base a los resultados, PhNAC024 podría estar regulando el inicio y la progresión de la senescencia foliar en petunia a través de la activación transcripcional de los genes *SAG* descritos e incluso modificando vías de señalización de la senescencia mediadas por ABA (se discute más adelante). Similar regulación para los putativos ortólogos de los genes *PhSGR1*, *PhPAO*, *PhSAG12* y *PhSAG113*, ha sido reportada en *Arabidopsis* (Zhang Y Gan, 2012), arroz (Lian *et al.*, 2014), cebada (Christiansen *et al.*, 2016), algodón (Fan *et al.*, 2015) y tomate (Ma *et al.*, 2018).

El gen que codifica para la nucleasa *AtBFN1* en *Arabidopsis* es un gen *SAG* ampliamente reportado que aumenta su expresión en estadios tardíos de la senescencia foliar (Balazadeh *et al.*, 2013), al igual que lo observado en hojas control de petunia (Fig. 20H). En *Arabidopsis*, la sobre-expresión de *AtORE1* activa fuertemente la expresión de *AtBFN1* a través de la interacción directa con su promotor (Matallana-Ramírez *et al.*, 2013). El hecho de que *PhBFN1* sea regulado por PhNAC024, sería la primera evidencia de regulación de esta nucleasa por parte de un miembro de la subfamilia NAP (Fan *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016; Zhang y Gan, 2012). Es interesante remarcar como los niveles de *PhBFN1* en las líneas de silenciamiento génico fueron casi nulos, lo que se correlaciona con los bajos niveles de *PhNAC024*, mientras que por ejemplo los valores de otros genes *SAG* como *PhSAG12* aumentaron en relación a las etapas iniciales (Fig. 20F y H). Las observaciones refuerzan la idea de que *PhBFN1* podría estar siendo regulado directamente por PhNAC024.

En la línea control, los niveles de *PhNAC024* aumentaron de forma anticipada en comparación con los niveles de *PhBFN1*, *PhPAO*, *PhSAG12* y *PhSAG113*. Esta diferencia temporal podría ser otra evidencia de que PhNAC024 regula la expresión de dichos genes de manera directa (Fig. 20). Otros ensayos como análisis de simple híbrido en levaduras, análisis de inmunoprecipitación de la cromatina acoplada a qPCR (ChIP-qPCR) o análisis de movilidad electroforética (EMSA, *electrophoretic mobility shift assay*) serán necesarios para dilucidar si esta regulación se produce efectivamente de forma directa a través de la unión de PhNAC024 al promotor de estos genes.

Teniendo en cuenta que PhNAC024 es capaz de regular el inicio y progresión de la senescencia foliar en petunia, se decidió evaluar las tasas de fotosíntesis en plantas cultivadas en cámara a mayor irradiancia (aprox.  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Fig. 24). Las líneas sobre-expresantes presentaron tasas de fotosíntesis menores respecto de la línea control en hojas jóvenes (día 0 en relación a la máxima expansión foliar) y no se observaron diferencias entre las líneas de silenciamiento y la línea control (Fig. 24B). En hojas maduras (día 35 en relación a la máxima expansión foliar) las líneas sobre-expresantes presentaron tasas de fotosíntesis menores respecto de la línea control, incrementando aún más las diferencias observadas en hojas jóvenes. De manera opuesta, la línea



RNAi-38 mantuvo tasas de fotosíntesis mayores que la línea control mientras que la línea RNAi-26 mostró tasas de fotosíntesis similares a las de la línea control (Fig. 24B). Las evidencias indican que la disminución de la expresión de *PhNAC024* a los valores de la línea RNAi-38 retrasa el inicio y progresión de la senescencia, manteniendo el sistema fotosintéticamente activo por periodos prolongados, generando líneas *stay-green* funcionales de la categoría A, según el criterio de Thomas y Howarth (2000). Por el contrario, sobre-expresar *PhNAC024* en etapas tempranas del desarrollo induciría la degradación de los cloroplastos mediante la acción de genes *SAG* como *PhSGR1* y *PhPAO* (Fig. 20), causando serios deterioros en la maquinaria fotosintética de las hojas. Esto se evidencia a su vez por los menores niveles de clorofila que presentan las hojas jóvenes de las líneas sobre-expresantes, evidenciando un proceso de senescencia ya avanzado en comparación con las líneas control y las de silenciamiento (Fig. 24A).

Al cultivar las plantas bajo condiciones de mayor irradiancia, se observó que los fenotipos de senescencia acelerada en las hojas de las líneas sobre-expresantes de *PhNAC024* se acentuaron, así como las diferencias existentes en la senescencia de las hojas entre las líneas de silenciamiento (Fig. 24). Las líneas sobre-expresantes mostraron niveles menores de clorofila respecto de la línea control y las líneas de silenciamiento, indicando que la senescencia ya se encuentra avanzada en hojas jóvenes recién expandidas, lo que se correlacionó con las menores tasas de fotosíntesis (Fig. 24A). En este contexto, la expresión temprana de *PhNAC024* podría estar generando un aumento en los niveles de *ROS* que normalmente acompaña el proceso de senescencia, sumado a que los intermediarios generados en los distintos pasos de la degradación de la clorofila en las vacuolas y plástidos pueden generar también daño oxidativo en condiciones de mayor irradiancia (Muñoz y Munné-Bosch, 2018; Hörtensteiner y Kräutler, 2011). A su vez, al cultivar las plantas en un ambiente de mayor irradiancia, los procesos de crecimiento y desarrollo foliar podrían verse acelerados y un menor grado de silenciamiento como el observado en la línea RNAi-26 quizá no sea suficiente como para retrasar el inicio de la senescencia, a diferencia de los experimentos donde se caracterizó la SNH con una irradiancia menor en donde las diferencias entre ambas líneas no fueron tan marcadas (Fig. 17). Mediciones adicionales como el contenido de proteínas solubles y niveles de expresión de *PhSAG12* son necesarios para terminar corroborar el grado de avance de la senescencia bajo estas condiciones de mayor irradiancia y poder comparar ambas líneas silenciadas.

En conjunto con los valores de fotosíntesis, se evaluaron los valores de transpiración en las hojas de las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento de *PhNAC024* sin presentar diferencias entre ellas (Anexo 3), deduciendo que las diferencias en las tasas de fotosíntesis se deben a diferencias en los programas de senescencia entre los diferentes genotipos. Análisis de microscopía en las hojas de las líneas transgénicas en comparación con la línea control están siendo analizados para

evidenciar posibles diferencias en la estructura del mesófilo y en la ultraestructura de los cloroplastos de estas células.

Bajo la condición de mayor irradiancia, las líneas sobre-expresantes tendieron a ser más pequeñas respecto de las plantas de la línea control. Teniendo en cuenta las diferencias encontradas en las tasas de fotosíntesis, se midieron dos parámetros asociados al rendimiento, la biomasa aérea y la tasa de producción de flores (Fig. 25). Las líneas sobre-expresantes mostraron una disminución en la biomasa aérea, la cual se correlaciona con la tasa de fotosíntesis neta (Fig. 24B), por lo que las hojas de las líneas sobre-expresantes podrían estar produciendo una menor cantidad de fotoasimilados que se reflejaría en una menor biomasa aérea (Fig. 25A). Por otro lado, las líneas de silenciamiento no mostraron diferencias en la biomasa aérea respecto de la línea control, a pesar de que en la línea RNAi-38 se observaron mayores tasas de fotosíntesis en hojas maduras (Fig. 24B). En este caso, la tasa de fotosíntesis neta no se correlaciona con la biomasa aérea de las plantas (Fig. 25A). Una posible explicación podría ser que la contribución de fotoasimilados a la producción de biomasa aérea total generados en cada hoja se vea modificada dependiendo del momento de la ontogenia de cada hoja en la que su fotosíntesis se encuentra afectada. Dicho de otra manera, una hoja en la cual su eficiencia fotosintética decae en etapas tempranas de su desarrollo, como lo observado en las líneas sobre-expresantes de *PhNAC024*, sería más perjudicial para la generación de biomasa que si los niveles de fotosíntesis comienzan a decaer en estadios más avanzados como lo que observado en las líneas de silenciamiento de *PhNAC024* (Fig. 24B). Una forma de corroborar esta hipótesis podría ser generar una disminución mayor o total de expresión de *PhNAC024* para aumentar las diferencias en los niveles de fotosíntesis neta con las líneas control y evaluar posibles diferencias en la generación de biomasa aérea.

Los trabajos reportados para los putativos ortólogos de *PhNAC024* en *Arabidopsis*, cebada y mijo (sobre-expresión en hojas de *Arabidopsis*) también presentan senescencia alterada en sus hojas, aunque los autores no midieron los niveles de fotosíntesis u otro parámetro asociado al rendimiento (Guo y Gan, 2016; Christiansen *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2018). Por otro lado, en líneas de silenciamiento para los putativos ortólogos de *PhNAC024* en algodón (*GhNAPi*) y arroz (*OsNAPi*), se observaron mayores tasas de fotosíntesis respecto de plantas control, las cuales se tradujeron en mejoras en la calidad de la fibra de algodón y en mayores rendimientos en las líneas de arroz, respectivamente (Fan *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2014). Los mayores niveles de fotoasimilados en líneas RNAi de los putativos ortólogos de *PhNAC024* no necesariamente se traducen en una biomasa mayor, sino que las mejoras en las características agronómicas parecerían ser dependientes de cada especie, principalmente relacionadas a las relaciones fuente/destino de cada una. En el caso del algodón, las líneas *GhNAPi* no muestran diferencias en su biomasa aérea, ni en su rendimiento medido como peso y/o número de frutos de algodón, aunque si en la calidad de la fibra como se mencionó previamente (Fan *et al.*, 2015). En arroz, las líneas *OsNAPi* mostraron un

mayor peso en los granos, lo cual es atribuido al periodo prolongado de llenado de granos por el fenotipo *stay-green* funcional en sus hojas (Liang *et al.*, 2014). En tomate, líneas de silenciamiento del putativo ortólogo de PhNAC024, *SINAC2*, no presentan diferencias en la biomasa aérea, aunque si se observa un aumento en el número de frutos y con mayores niveles de azúcares en comparación con el genotipo control (Ma *et al.*, 2018). Si bien los autores no evaluaron la tasa de fotosíntesis en estas líneas, el retraso de la senescencia foliar estaría generando una mayor cantidad de fotoasimilados que serían removilizados a los frutos (Ma *et al.*, 2018). Estas evidencias indican que la disminución de los putativos ortólogos de AtNAP pueden generar líneas *stay-green* funcionales en dicotiledóneas y en monocotiledóneas, evidenciando una vez más la actividad altamente conservada en la regulación de la senescencia de la subfamilia NAP (Fen *et al.*, 2015).

En base a lo descrito, decidimos evaluar si las variaciones en la tasa fotosintética observada en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento de *PhNAC024* tendría algún efecto en la tasa de producción de flores, un parámetro asociado al rendimiento muy importante en la industria de plantas ornamentales (Fig. 25B). Este parámetro fue similar entre los distintos genotipos, con lo cual no se observó correlación entre el número de flores producidas y las diferencias observadas en las tasas de fotosíntesis (Fig.25B). En tomate, líneas de silenciamiento de *SINAC2* generaron un mayor número de frutos (lo que es equivalente a producción de flores), mientras que líneas de sobre-expresión de *SINAC2* presentaron menor cantidad de frutos (Ma *et al.*, 2018). En petunia, sin embargo, no encontramos diferencias en la tasa de producción de flores, por lo que esta no estaría directamente ligada a la capacidad fotosintética de las hojas, sugiriendo diferencias de regulación dentro de la familia Solanaceae.

Por último, se decidió evaluar si PhNAC024 modula la senescencia inducida por oscuridad y la sensibilidad frente al agregado exógeno de ABA en las hojas. La senescencia inducida por oscuridad es interesante de evaluar en este cultivo, ya que muchas de las variedades comerciales de *P. hybrida* existentes en el mercado suelen presentar el largo de sus entrenudos muy cortos, generando una roseta en la cual las hojas jóvenes sombrean a las hojas maduras en las posiciones más basales del tallo. Ensayos preliminares de inducción de la senescencia por oscuridad mostraron una clara tendencia de las líneas sobre-expresantes de *PhNAC024* a acelerar este proceso a nivel de planta entera, mientras que las líneas de silenciamiento mostraron una tendencia a retrasar este proceso en comparación con la línea control (Fig. 26). Estos experimentos necesitan ser completados con mediciones de parámetros fisiológicos y moleculares para corroborar dicha hipótesis y dilucidar posibles vías de acción de PhNAC024 en este tipo de senescencia. En *Arabidopsis*, la expresión de *AtNAP* no es inducida por oscuridad (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005), aunque en líneas mutantes *atnap* la senescencia inducida por oscuridad en hojas cortadas se encuentra retrasada, sugiriendo que *AtNAP* estaría participando también como promotor en la vía de señalización de este tipo de senescencia (Gan y Guo, 2006). A su vez, sus

respectivos ortólogos en mijo, tomate y arroz, *SiNAC1*, *SINAP2* y *OsNAP* promueven la senescencia inducida por oscuridad en plantas sobre-expresantes, respectivamente (Liang *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2018, Ma *et al.*, 2018). Este tipo de senescencia también se vio modificada en líneas transgénicas de algodón, aunque plantas de cebada sobre-expresantes del putativo ortólogo de *AtNAP* no presentaron cambios, sugiriendo vías de señalización similares, aunque también divergentes entre distintas especies (Christiansen *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2015).

Por otro lado, sabiendo que *AtNAP* así como varios de sus putativos ortólogos en las distintas especies mencionadas participan en la senescencia foliar mediada por ABA, regulando su biosíntesis, degradación y/o señalización, se decidió analizar la senescencia en respuesta al agregado exógeno de ABA en hojas cortadas de plantas cultivadas *in vitro*, con el objetivo de determinar posibles cambios de sensibilidad entre los distintos genotipos (Fig. 27). Basados en la visualización del amarillamiento de las hojas, las líneas sobre-expresantes de *PhNAC024* parecerían acelerar la senescencia en presencia de ABA mientras que las líneas de silenciamiento la retrasarían notablemente en comparación con la línea control (Fig. 27). Sin embargo, mediciones de parámetros fisiológicos y/o moleculares asociados a la senescencia son necesarios para corroborar dicha hipótesis. Durante los ensayos de SNH, se midió la expresión de un gen de biosíntesis de ABA en las hojas de las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento (Fig. 17). La expresión del putativo ortólogo de *SINCED1*, uno de los genes de biosíntesis de ABA con mayores niveles de expresión en tomate (Ma *et al.*, 2018), fue errática entre los distintos genotipos de petunia (datos no mostrados), por lo que otros genes asociados a la biosíntesis, degradación y/o señalización de ABA en petunia deberán ser analizados.

Los resultados preliminares que muestran sensibilidad al ABA alterada en las plantas transgénicas de *PhNAC024* cultivadas *in vitro* (Fig. 27), se correlacionan con la participación en la senescencia mediada por ABA descrita para los putativos ortólogos en múltiples especies. En tomate, la sensibilidad a la senescencia inducida por ABA en líneas de silenciamiento y sobre-expresión de *SINAP2* se vio alterada al igual que en petunia (Ma *et al.*, 2018), mientras que plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del ortólogo de *PhNAC024* en mijo, *SiNAC1*, también presentaron senescencia acelerada frente al agregado de ABA al compararlas con plantas control (Ren *et al.*, 2018).

Los putativos ortólogos de *PhNAC024* en *Arabidopsis*, tomate, algodón, mijo y arroz son fuertemente inducidos a las pocas horas en plántulas tratadas con ABA exógeno, mientras que plantas de arroz y tomate deficientes en la biosíntesis de ABA presentan menor expresión de los putativos ortólogos de *PhNAC024* en sus hojas, demostrando que los miembros de esta subfamilia son inducidos por ABA y que esta característica estaría conservada entre especies (Yang *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2018). Ensayos de expresión

relativa de *PhNAC024* en las hojas de la línea control sometida a tratamientos con ABA exógeno serán necesarios para determinar el comportamiento de *PhNAC024* en petunia.

Líneas sobre expresantes de *OsNAP*, presentan menores niveles de ABA, así como de genes asociados a su biosíntesis en plantas de arroz, mientras que por el contrario, líneas de silenciamiento de *GhNAP* presentan menores niveles de ABA en hojas de algodón y la sobre-expresión de *AtNAP* y *SiNAC1* en *Arabidopsis* inducen el aumento de expresión de genes de biosíntesis de ABA y su acumulación (Yang *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2014;). En tomate, *SINAC2* aumenta los niveles de genes asociados a la biosíntesis de ABA, aunque también los genes involucrados en su degradación (Ma *et al.*, 2018). Estos resultados indican que, si bien todos los miembros de la subfamilia NAP mencionados son inducidos por ABA, los mecanismos de regulación y retroalimentación pueden variar entre las distintas especies. Análisis de genes asociados a la biosíntesis y degradación de ABA serán necesarios en las líneas de silenciamiento y sobre-expresión de *PhNAC024* para dilucidar si es capaz de regular la senescencia mediada por ABA modificando los niveles de esta hormona.

Miembros de la subfamilia NAP regulan la senescencia mediada por ABA no solo al modificar su biosíntesis o degradación, sino que también regulan genes involucrados en las vías de señalización de esta hormona. Se ha reportado que *AtNAP* se une directamente al promotor de *SAG113* promoviendo su transcripción (Zhang y Gan, 2012). *SAG113* es una proteína fosfatasa localizada en el aparato de Golgi, la cual regula el movimiento estomático mediado por ABA, impidiendo que los estomas se cierren y por consiguiente aumentando la desecación y pérdida de agua en hojas senescentes (Zhang *et al.*, 2012). De esta manera, *AtNAP* promueve la senescencia regulando negativamente el cierre estomático mediado por ABA (Zhang y Gan, 2012). Como se describió anteriormente, *PhNAC024* parecería estar regulando los niveles de este gen en petunia (Fig. 20G), participando en las vías de señalización de la senescencia mediada por ABA. En tomate, líneas sobre-expresantes de *SINAC2* también promueven la transcripción de *SISAG113*, uniéndose directamente a su promotor (Ma. *et al.*, 2018). En líneas de silenciamiento de *GhNAP*, los niveles de *GhSAG113* disminuyen, aunque los ensayos de interacción demuestran que *GhNAP* no se une al promotor de *GhSAG113* (Fan *et al.*, 2015). Resultados similares se observaron en arroz, donde *OsNAP* promueve la transcripción de *OsPP2C09* y *OsPP2C68*, ortólogos de *SAG113*, aunque sin unirse directamente a su promotor (Liang *et al.*, 2014) evidenciando distintos mecanismos en las vías de señalización asociadas al ABA entre distintas especies.

Como se mencionó anteriormente, ensayos de interacción entre *PhNAC024* y el promotor de *PhSAG113*, o ChIP-qPCR serán necesarios para comprobar si dicha interacción se encuentra conservada en petunia. En *Arabidopsis*, la sobre-expresión de *AtSAG113* en líneas *atnap* recupera parcialmente el fenotipo *stay-green* que presenta esta mutante (Zhang y Gan, 2012). Experimentos

similares sobre-expresando *PhSAG113* en las líneas RNAi-38 de petunia podrían ser realizados para corroborar la regulación de *PhNAC024* sobre *PhSAG113*.

En base a esta información y al análisis preliminar de sensibilidad al ABA en las líneas transgénicas cultivadas *in vitro* (Fig. 27), es posible inferir que *PhNAC024* podría promover la senescencia en hojas de petunia mediante la regulación de la biosíntesis y/o de las vías señalización asociadas al ABA, aunque es necesario realizar experimentación adicional para confirmar esta hipótesis.

### **PhNAC024 y su rol como regulador de la senescencia en los pétalos de *P. hybrida***

La expresión de *PhNAC024* aumentó fuertemente en plantas control durante la progresión de la SNP y SIP en las flores (Figs. 9-10). Teniendo en cuenta estas observaciones, se evaluó en las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC024* la progresión de la SNP y la SIP. Los resultados mostraron diferencias de longevidad en los pétalos entre los distintos genotipos durante la SNP (Fig. 22), mientras que no se detectaron diferencias entre los genotipos en los pétalos de flores polinizadas (SIP) (datos no mostrados). De manera similar a lo observado en la SNH, la longevidad de las flores en la SNP se correspondió con los niveles de transcritos de *PhNAC024*, siendo menor en las líneas sobre-expresantes que presentaron altos niveles de *PhNAC024* desde la antesis, y mayor en la línea RNAi-38 la cual mostró niveles muy bajos de *PhNAC024* (Fig. 22).

La disminución de *PhNAC024* en la línea RNAi-26 fue apreciable recién en etapas muy tardías (día 6), no siendo suficiente como para retrasar el inicio de la senescencia de forma significativa en relación a la línea control (Fig. 22). Al igual que lo observado en las hojas, la línea RNAi-26 no disminuyó los niveles de *PhNAC024* tan fuertemente como en la línea RNAi-38 (Fig. 18). Mientras que la disminución de *PhNAC024* en etapas intermedia/tardías fue suficiente como para retrasar la SNH de forma significativa (Fig. 17), la disminución de *PhNAC024* en etapas intermedia/tardías de la SNP no resultó ser suficiente (Fig. 22). Estos resultados podrían indicar una mayor importancia de *PhNAC024* en la regulación de la SNH en comparación con la SNP.

SAG12 ha sido reportado como un excelente marcador de senescencia en pétalos de *Arabidopsis* y en otras especies como Wallflower (*Erysimum linifolium*) e incluso en *P. hybrida* (Wagstaff *et al.*, 2009; Price *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2005). La expresión de *PhSAG12* fue elevada de manera prematura en las líneas sobre-expresantes de *PhNAC024* en comparación con la línea control, mientras que en la línea RNAi-38 su aumento fue retrasado (Fig. 23A). Además, se evaluaron los niveles de la nucleasa *PhBFN1* como otro posible marcador del proceso, y al igual a lo ocurrido en las hojas, dicho gen aumentó de forma prematura en las líneas sobre-expresantes y su aumento fue retrasado en ambas líneas de silenciamiento (Fig. 23B). Esta variación en los niveles de

*PhBFN1* en los pétalos de las líneas transgénicas refuerza la idea de una regulación directa o indirecta por parte de *PhNAC024*, aunque en los pétalos es posible que esta regulación sea distinta a la propuesta para las hojas, ya que en los pétalos ambos genes se co-expresan en la línea control (Fig. 23) mientras que en las hojas *PhNAC024* se expresa antes que *PhBFN1* (Fig. 20). Si bien por el momento *PhBFN1* no fue descrito como un gen asociado a la senescencia de los pétalos, su ortólogo *AtBFN1*, fue previamente reportado de aumentar su expresión en un transcriptoma foliar y en pétalos de flores polinizadas de *Arabidopsis* (Wagstaff *et al.*, 2009).

Las flores de petunia son etileno-sensibles, presentando un pico de etileno en los pétalos previo a la senescencia, seguido de un aumento en los niveles de ABA cuando las corolas comienzan su marchitamiento (Langston *et al.*, 2005; Ferrante *et al.*, 2006). Como medida indirecta de la cantidad de estas hormonas, se evaluó la expresión de genes asociados a la biosíntesis de etileno, *PhACO1*, (Chang *et al.*, 2014) y a la biosíntesis de ABA, *PhNCED1* (Yin *et al.*, 2015) (Fig. 23C y D). En la línea control y en las líneas de silenciamiento, el pico de *PhACO1* ocurre en el día 5 (Fig. 23C), el cual es seguido de un aumento de expresión de *PhNCED1*, aunque en las líneas de silenciamiento el aumento de *PhNCED1* se ve retrasado en el tiempo, infiriendo que los niveles de ABA endógeno, y por ende el proceso de senescencia, se encuentra retrasado en las líneas de silenciamiento de *PhNAC024*, siendo mayor en la línea RNAi-38 respecto de la línea RNAi-26 (Fig. 23D). Los niveles de *PhACO1* se mantuvieron elevados y constantes desde la antesis en los pétalos de las líneas sobre-expresantes y no se observó el aumento de *PhNCED1* (Fig. 23 C y D). Una posible explicación a la falta de aumento de *PhNCED1* (ABA endógeno), sería la ocurrencia de un pico de *PhACO1* (etileno), entendido como un cambio brusco en su concentración, en los días previos al inicio de la senescencia como ha sido previamente reportado (Ferrante *et al.*, 2006), lo cual no ocurre en las líneas sobre-expresantes de *PhNAC024*, ya que los valores de *PhACO1* se mantienen elevados y relativamente constantes (Fig. 23C). De todas maneras, los elevados niveles de *PhACO1*, asociados a un aumento endógeno de etileno en etapas tempranas, explicarían la inducción prematura de la senescencia observada en los pétalos de las líneas sobre-expresantes de *PhNAC024*, siendo esta hormona el principal inductor de la senescencia en pétalos de petunia (Ferrante *et al.*, 2006) (Fig. 22 y 23). En base a estos resultados y a los momentos temporales de expresión de estos genes en la línea control, se podría inferir que *PhNAC024* actuaría río abajo en la vía del etileno, regulando a su vez genes asociados a la senescencia como *PhBFN1*. Además, *PhNAC024* podría promover la expresión de *PhACO1*, generando mayores niveles etileno, y contribuyendo a la progresión del proceso. La ausencia de *PhNAC024* no impide que se produzca el pico de etileno previo a la senescencia, el cual dependería de otros factores, aunque su presencia sería necesaria para regular los niveles de *PhNCED1* y de esa manera determinar el momento en el cual se debería producir el aumento en los niveles de ABA que anteceden al marchitamiento de los pétalos.

Estos resultados son coherentes con los observado por Shinozaki *et al.* (2014), en donde midieron la expresión del putativo ortólogo de *AtNAP*, *InNAP* (57% de identidad con *AtNAP*), en dos cultivares de la planta ornamental *Ipomoea nil* que difieren en la longevidad de sus pétalos. El cultivar Pekin presenta flores con una longevidad menor y su senescencia es regulada por los niveles de etileno endógeno, mientras que el cultivar Violeta, presenta longevidad mayor y la senescencia en sus pétalos no es regulada por los niveles de etileno endógeno (Shinozaki *et al.*, 2014). La expresión de *InNAP* aumenta prematuramente en la variedad Pekin, lo cual se correlaciona con un aumento de etileno endógeno y menor longevidad de sus flores, mientras que en la variedad Violeta *InNAP* aumenta en estadios tardíos. De esta manera los autores asocian los niveles de *InNAP* a la longevidad de los pétalos, aunque su regulación por parte del etileno no fue concluyente (Shinozaki *et al.*, 2014). Este trabajo es la única evidencia que asocia a un ortólogo de *AtNAP* con la regulación de la senescencia floral, sin embargo, ningún ensayo de evaluación de función fue realizado para corroborar dicha hipótesis por parte de los autores (Shinozaki *et al.* 2014). Ensayos con inhibidores de la percepción/señalización del etileno como el 1-metilciclopropeno (1-MCP, *methylcyclopropene*), tiosulfato de plata (STS, *silver thiosulfate*) o mediciones en petunias transgénicas insensibles al etileno (*etr1-1*, *ethylene-insensitive etr1-1*) serán necesarios para corroborar si *PhNAC024* actúa promoviendo la senescencia de los pétalos mediante la acción del etileno. Además, otros marcadores fisiológicos como los niveles de proteínas solubles o el número de células muertas, utilizando por ej. el colorante *Evans Blue*, serán necesarios para corroborar las variaciones en la senescencia de los pétalos en las líneas de sobre-expresión y de silenciamiento de *PhNAC024* en *P. hybrida*.

Por lo tanto, los resultados descritos para *PhNAC024* en la presente tesis representan la primera evidencia concreta que demuestra el rol en la regulación de la senescencia natural de los pétalos de un miembro de la subfamilia NAP (Kim *et al.*, 2016). De esta manera, podemos decir que *PhNAC024* juega un papel central en la regulación de la senescencia natural en ambos órganos en *P. hybrida*, y probablemente también en la senescencia inducida por oscuridad en las hojas. Además de estar asociado a la vía del ABA y del etileno, recientemente *AtNAP* fue descrito de participar en la senescencia mediada por la edad, pero en una vía inducida por giberelinas, interaccionando directamente con las proteínas DELLA (Lei *et al.*, 2020). Estas evidencias, así como los resultados descritos en la presente tesis, sugieren que *PhNAC024* actuaría como un nodo central capaz de desencadenar distintos procesos de senescencia, probablemente modulando distintas vías hormonales.



### **PhNAC017 y su rol como regulador de la senescencia en los pétalos de *P. hybrida***

El segundo candidato elegido de la familia NAC para estudiar su función en la senescencia de petunia fue *PhNAC017*. Como se mencionó previamente, PhNAC017 es el putativo ortólogo de AtORE1 el cual aumenta su expresión en hojas de Arabidopsis promoviendo la senescencia foliar en una manera etileno dependiente (Kim *et al.*, 2009). A su vez, InEPH1 de *Ipomoea nil*, un putativo ortólogo de AtORE1, promueve la senescencia en los pétalos de esta especie y representa hasta el momento al único NAC con un rol reportado en la senescencia de las flores (Shibuya *et al.*, 2014).

Con el objetivo de caracterizar el rol de PhNAC017 durante la SNH en *P. hybrida*, se analizó la expresión de *PhNAC017* en líneas transgénicas independientes de sobre-expresión y silenciamiento génico generadas (Fig. 29A). A diferencia de lo reportado para sus putativos ortólogos en Arabidopsis (Kim *et al.*, 2009) y en tomate (Lira *et al.*, 2017), PhNAC017 no parece tener un rol en la regulación de la SNH de petunia, evidenciado por la longevidad de las hojas entre los distintos genotipos y las cuantificaciones de los niveles de clorofila total y proteínas solubles (Fig. 29). Una posible explicación a la falta de fenotipo en senescencia podría ser la redundancia génica con otros miembros de la familia NAC. Si bien PhNAC017 fue el miembro con mayor identidad según el análisis de BLAST, otros genes aparecieron como putativos ortólogos con porcentajes muy parecidos, aunque menores (datos no mostrados). Incluso en Arabidopsis, el gen ANAC059/ORS1 es considerado una duplicación de AtORE1, el cual aumenta su expresión en hojas senescentes (Balazadeh *et al.*, 2011).

De manera similar a como se hizo para PhNAC024, se estudió si la alteración en los niveles de *PhNAC017* en las líneas transgénicas podría alterar la arquitectura de las plantas y el tiempo a floración (Fig. 30), aunque no se detectaron cambios fenotípicos en las mismas respecto de las plantas control. Resultados similares fueron descritos para sus putativos ortólogos en Arabidopsis y tomate (Kim *et al.*, 2009; Lira *et al.*, 2017).

A diferencia de lo ocurrido en la SNH, los ensayos asociados a la evaluación de la SNP mostraron una regulación muy fuerte por parte de PhNAC017 (Fig. 29), aunque no se detectaron diferencias en la longevidad de los pétalos en flores polinizadas (SIP) en las líneas transgénicas (datos no mostrados). La longevidad de los pétalos se correlacionó fuertemente con los niveles de transcritos de *PhNAC017*, siendo menor en las líneas sobre-expresantes que presentaron altos niveles de *PhNAC017* desde la antesis, y mayor en ambas líneas de silenciamiento las cuales presentaron niveles muy bajos de *PhNAC017* (Fig. 29B). Además, los niveles de *PhSAG12* confirmaron que la diferencia en la longevidad de los pétalos se debe a un inicio prematuro de la SNP en las líneas sobre-expresantes y a un inicio y/o progresión retrasado en las líneas de silenciamiento de *PhNAC017* (Fig. 32A).

A su vez, el aumento de expresión de la nucleasa *PhBFN1* en los pétalos de *P. hybrida*, reportada como un gen blanco directo de *AtORE1* en *Arabidopsis* (Matallana-Ramírez *et al.*, 2013), fue prematuro en las líneas sobre-expresantes y retrasado en las líneas de silenciamiento (Fig. 32B). En base a lo descrito en *Arabidopsis*, *PhNAC017* podría estar uniéndose de manera directa al promotor de *PhBFN1* promoviendo su expresión conforme avanza la SNP. Además, *PhNAC017* aumenta su expresión en estadios levemente anteriores que *PhBFN1*, lo que podría indicar una posible regulación directa (Fig. 31B y 32B). Estas hipótesis deberán ser confirmadas mediante ensayos de interacción de *PhNAC017* con el promotor de *PhBFN1* o mediante análisis de ChIP-qPCR, como fue también previamente planteado para *PhNAC024* y el promotor de *PhBFN1*.

Los resultados coinciden con lo reportado por Shibuya *et al.* (2014), en donde *InEPH1*, un putativo ortólogo de *AtORE1*, promueve la senescencia en los pétalos de la planta ornamental *Ipomoea nil*. A su vez, los autores demuestran que *InEPH1* no presenta un rol claro en la senescencia foliar a diferencia de su putativo ortólogo de *Arabidopsis*, tal a como se observó para *PhNAC017* en la regulación de la SNH en *P. hybrida* (Fig. 29). Estas evidencias indican que proteínas NAC similares en cuanto su secuencia aminoacídica podrían regular diferencialmente distintos tipos de senescencia según las especies.

Mediciones de la expresión relativa de genes de biosíntesis y de degradación de hormonas como el ABA y el etileno, así como análisis de sensibilidad alterada al etileno utilizando inhibidores como 1-MCP o STS al igual que lo descrito para los pétalos de las líneas transgénicas de *PhNAC024*, serán necesarios para terminar de confirmar como *PhNAC017* regula positivamente la senescencia en los pétalos de *P. hybrida*. El caso del etileno es particularmente interesante ya que como se describió anteriormente, en petunia esta hormona es la principal promotora de la senescencia en los pétalos, mientras que la regulación de la senescencia por parte de *InEPH1* en el cultivar etileno-insensible Violeta de *Ipomoea nil* no parecería estar regulada por los niveles de esta hormona (Shibuya *et al.*, 2014), demostrando que ortólogos de la familia NAC pueden tener mecanismos de regulación de la senescencia floral diferente entre especies.

## CONCLUSIONES

Los parámetros fisiológicos y moleculares seleccionados permitieron caracterizar satisfactoriamente la progresión, así como la ventana temporal de los tres procesos de senescencia analizados en las hojas y pétalos de *P. hybrida*.

Se identificaron a los putativos ortólogos de aquellos miembros asociados a la senescencia de las familias NAC y WRKY en *P. hybrida*, confirmando que las proteínas identificadas presentan los dominios conservados correspondientes a cada familia.

Se caracterizaron los perfiles de expresión de aquellos miembros asociados a la senescencia de las familias NAC y WRKY en tres tipos de senescencia que ocurren en las hojas y en los pétalos de *P. hybrida*. Ambas familias de FTs cuentan con miembros que cambian su expresión de forma consistente y en etapas relativamente tempranas de cada proceso de senescencia, evidenciando que serían importantes en la regulación de la senescencia en petunia.

Se identificaron 8 candidatos fuertes de la familia NAC y 9 candidatos de la familia WRKY que debido a sus consistentes perfiles de expresión y la presencia de putativos ortólogos con función reportada en senescencia en grupos funcionales podrán ser analizados en futuros estudios de funcionalidad en la senescencia foliar y floral de *P. hybrida*.

Se determinó el rol de PhNAC024 como regulador positivo de la SNH y la SNP en *P. hybrida*, aunque no parecería tener un rol en la regulación de la SIP, ni en otros aspectos asociados al desarrollo.

*PhNAC024* actuaría como un gen *stay-green* funcional, modulando las tasas de fotosíntesis mediante la regulación del inicio y progresión de la senescencia foliar, al regular la transcripción de manera directa o indirecta de genes asociados a la senescencia como nucleasas o cisteín-proteasas, genes involucrados en la degradación de los cloroplastos y genes involucrados en la señalización y/o biosíntesis de hormonas promotoras de la senescencia como el ABA.

PhNAC024 actúa como un regulador positivo de la senescencia inducida por la edad. Estudios preliminares indican que además regularía positivamente la senescencia inducida por oscuridad y que la senescencia en las hojas podría estar modulada por PhNAC024 a través de cambios en la sensibilidad al ABA.

La iniciación prematura de la senescencia foliar por parte de PhNAC024 en *P. hybrida* se correlacionó con una menor producción de biomasa aérea, aunque no parecería afectar la tasa de producción de flores.

PhNAC017 no parecería participar en la regulación de la senescencia foliar en petunia y tampoco parecería regular aspectos asociados al desarrollo.

PhNAC017 actúa como un regulador positivo de la SNP en *P. hybrida*, posiblemente modulando la expresión de genes asociados a la senescencia como *PhSAG12* y *PhBFN1*, aunque no parecería tener un rol claro en la regulación de la SIP.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Identificación por tBLASTn de putativos ortólogos de la familia NAC asociados a la senescencia en *Petunia hybrida*, *Petunia axillaris* y *Petunia inflata* a partir de las 41 proteínas NAC seleccionadas en Arabidopsis. Los asteriscos indican proteínas de Arabidopsis con función reportada en senescencia. (P) indica secuencia parcial de *Petunia hybrida*.

<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Petunia hybrida</i> transcriptoma (Villarino <i>et al.</i> , 2014)					<i>Petunia axillaris</i> genoma borrador (Bombarely <i>et al.</i> , 2016)				<i>Petunia inflata</i> genoma borrador (Bombarely <i>et al.</i> , 2016)			
Código AGI	Sinónimos	Mejor entrada	Nombre	e-value	Identidad (%)	Cobertura (%)	Accesión	e-value	Identidad (%)	Cobertura (%)	Accesión	e-value	Identidad (%)	Cobertura (%)
At3G15500	ANAC055; NAC055; NAC3	comp33806_c0_seq1	PhNAC101	4E-116	67	84	Peaxi162Scf00998g00126.1	E-118	68	84	Peinf101Scf01175g01017.1	E-117	69	81
At1G52890	ANAC019; NAC019	comp33806_c0_seq1	PhNAC101	6E-113	67	85	Peaxi162Scf00998g00126.1	E-116	67	84	Peinf101Scf01175g01017.1	E-116	70	79
At4G27410	ANAC072; RD26	comp33806_c0_seq1	PhNAC101	5E-114	66	84	Peaxi162Scf00998g00126.1	E-125	69	84	Peinf101Scf01175g01017.1	E-123	69	82
At1G01720 (*)	ANAC002; ATAF1	comp30243_c0_seq1	PhNAC097	4E-132	68	98	Peaxi162Scf00051g01410.1	E-134	68	98	Peinf101Scf02544g00007.1	E-134	68	98
At1G77450	ANAC032; NAC032	comp30243_c0_seq1	PhNAC097	6E-109	61	96	Peaxi162Scf00051g01410.1	E-111	61	96	Peinf101Scf02544g00007.1	E-111	61	96
At5G63790	ANAC102; NAC102	comp16927_c0_seq1	PhNAC033	E-104	55	83	Peaxi162Scf00842g00211.1	E-107	55	82	Peinf101Scf02544g00007.1	E-101	56	82
At3g15510	ANAC056	comp16927_c0_seq1	PhNAC033	4E-69	59	54	Peaxi162Scf00181g00124.1	E-125	54	99	Peinf101Scf00316g07007.1	E-127	55	99
At1g52880	ANAC018; NAM	comp16927_c0_seq1	PhNAC033	9E-63	65	50	Peaxi162Scf00181g00124.1	E-101	77	58	Peinf101Scf00316g07007.1	E-102	77	58
At3G04070	ANAC047; NAC047	comp30243_c0_seq1	PhNAC097	5E-69	64	49	Peaxi162Scf01153g00036.1	2E-82	67	50	Peinf101Scf01175g02010.1	E-82	44	95
At1G69490 (*)	ANAC029; NAP; ATNAP	comp559557_c0_seq1 (P)	PhNAC024	3E-77	86	47	Peaxi162Scf00222g00624.1	E-110	67	82	Peinf101Scf03525g00016.1	E-111	68	82
At5g13180 (*)	ANAC083; NAC083; VNI2	comp11118_c0_seq1	PhNAC106	2E-83	62	85	Peaxi162Scf00128g01627.1	2E-91	65	85	Peinf101Scf00889g02030.1	3E-91	65	85
At2g33480	ANAC041; NAC041	comp11118_c0_seq1	PhNAC106	3E-70	67	97	Peaxi162Scf00128g01627.1	5E-80	58	97	Peinf101Scf00889g02030.1	7E-79	55	97
At5G64530	ANAC104	comp24829_c0_seq2	PhNAC089	4E-83	73	99	Peaxi162Scf00001g00044.1	2E-82	71	99	Peinf101Scf00791g12003.1	E-80	70	99
At2g43000 (*)	ANAC042; NAC042; JUB1	comp27121_c0_seq1	PhNAC004	4E-53	50	62	Peaxi162Scf00452g00720.1	8E-89	65	67	Peinf101Scf01514g01015.1	7E-89	65	67
At1g71930	ANAC030; VND7	comp102798_c0_seq1	PhNAC086	8E-81	52	86	Peaxi162Scf00268g01214.1	E-110	53	98	Peinf101Scf01964g01035.1	E-108	53	98
At2g18060	ANAC037; VND1	comp102798_c0_seq1	PhNAC086	4E-148	63	99	Peaxi162Scf00083g00915.1	E-159	62	99	Peinf101Scf01063g02013.1	E-155	61	99
At1g62700	ANAC026; VND5	comp22278_c0_seq3 (P)	PhNAC082	8E-114	57	84	Peaxi162Scf00241g00423.1	E-120	55	100	Peinf101Scf03555g00019.1	E-113	54	100
At1g12260	ANAC007; NAC07; VND4	comp17026_c0_seq1 (P)	PhNAC052	7E-125	53	97	Peaxi162Scf00241g00423.1	E-132	54	100	Peinf101Scf03555g00019.1	E-126	53	100
At4g28530	ANAC074; NAC074	comp20998_c0_seq2 (P)	PhNAC051	5E-90	73	50	Peaxi162Scf00987g00110.1	8E-92	73	51	Peinf101Scf00055g20009.1	5E-63	54	52
At3g12977	n. a	comp89070_c0_seq1	PhNAC074	2E-86	48	95	Peaxi162Scf00232g01126.1	E-87	48	95	Peinf101Scf00055g20009.1	E-88	48	95
At1g56010	ANAC021; ANAC022; NAC1	comp89070_c0_seq1	PhNAC074	3E-95	54	90	Peaxi162Scf00232g01126.1	E-104	52	98	Peinf101Scf00055g20009.1	E-105	52	98
At5g18270	ANAC087	comp9709_c0_seq1 (P)	PhNAC058	E-88	70	56	Peaxi162Scf00076g00071.1	2E-95	67	62	Peinf101Scf02764g00025.1	9E-98	56	83
At3g04060 (*)	ANAC046; NAC046	comp9709_c0_seq1 (P)	PhNAC058	9E-84	69	54	Peaxi162Scf00076g00071.1	4E-93	68	59	Peinf101Scf02764g00025.1	3E-94	68	59
At5g61430	ANAC100; NAC100	comp22005_c0_seq3	PhNAC017	3E-114	53	100	Peaxi162Scf00274g00443.1	E-137	63	91	Peinf101Scf01556g09036.1	E-135	63	91
At5g39610 (*)	ANAC092; NAC6; ORE1	comp22005_c0_seq3	PhNAC017	4E-109	56	96	Peaxi162Scf00129g00011.1	E-105	53	96	Peinf101Scf00699g00016.1	E-109	56	96
At3g29035 (*)	ANAC059; ORS1	comp22005_c0_seq3	PhNAC017	2E-99	52	96	Peaxi162Scf00129g00011.1	E-103	51	96	Peinf101Scf00699g00016.1	E-103	53	94
At1g54330	ANAC020; NAC020	comp22839_c0_seq1	PhNAC025	3E-81	73	51	Peaxi162Scf00521g00049.1	4E-86	48	95	Peinf101Scf00099g02018.1	2E-88	49	97
At3g17730	ANAC057; NAC057	comp22839_c0_seq1	PhNAC025	8E-123	75	95	Peaxi162Scf00171g00619.1	E-124	75	95	Peinf101Scf05738g00029.1	E-122	75	95
At5G22290	ANAC089	comp18132_c0_seq1 (P)	PhNAC099	E-75	69	44	Peaxi162Scf00091g00074.1	3E-79	44	80	Peinf101Scf01611g02014.1	5E-59	39	79
At5G64060	ANAC103; NAC103	comp12410_c0_seq1 (P)	PhNAC094	5E-82	66	49	Peaxi162Scf00589g00322.1	2E-83	63	53	Peinf101Scf00652g08018.1	4E-83	63	52
At1G32870	ANAC013; NAC13	comp14368_c0_seq1	PhNAC105	6E-72	61	42	Peaxi162Scf00226g00319.1	E-101	38	97	Peinf101Scf02631g05031.1	E-101	36	97
At1G34190	ANAC017; NAC017; RAO2	comp14368_c0_seq1	PhNAC105	4E-125	43	94	Peaxi162Scf00226g00319.1	E-139	44	95	Peinf101Scf02631g05031.1	E-139	43	95
At1G34180 (*)	ANAC016; NAC016	comp14368_c0_seq1	PhNAC105	4E-103	39	95	Peaxi162Scf00226g00319.1	E-121	39	95	Peinf101Scf02631g05031.1	E-122	39	95
At5g04410	ANAC078; NAC2	comp26387_c0_seq2	PhNAC050	6E-131	43	100	Peaxi162Scf00253g00321.1	E-146	43	99	Peinf101Scf00809g02027.1	E-142	42	99
At3g10500 (*)	ANAC053; NAC053; NTL4	comp26387_c0_seq2	PhNAC050	E-139	45	99	Peaxi162Scf00253g00321.1	E-150	46	99	Peinf101Scf00809g02027.1	E-145	45	99
At3g10490	ANAC051; ANAC052	comp20693_c0_seq1	PhNAC095	E-88	65	44	Peaxi162Scf01105g00015.1	E-115	45	98	Peinf101Scf00735g00009.1	E-115	45	98
At4G35580 (*)	CBNAC; NTL9	comp32221_c0_seq1	PhNAC023	4E-79	38	77	Peaxi162Scf01447g00005.1	E-79	40	55	Peinf101Scf01482g10004.1	E-79	40	55
At3G49530	ANAC062; NAC062	comp32221_c0_seq1	PhNAC023	8E-82	45	64	Peaxi162Scf01447g00005.1	9E-92	43	64	Peinf101Scf01482g10004.1	7E-92	43	64
At3G04420	ANAC048	comp22005_c0_seq3	PhNAC017	3E-28	42	38	Peaxi162Scf00129g00011.1	7E-30	32	66	Peinf101Scf01482g10004.1	2E-28	36	49
At1G02220	ANAC003	comp22005_c0_seq3	PhNAC017	2E-24	41	32	Peaxi162Scf00129g00011.1	E-25	38	37	Peinf101Scf01482g10004.1	3E-24	37	49
At1G02250	ANAC005	comp32221_c0_seq1	PhNAC023	2E-27	41	42	Peaxi162Scf01447g00005.1	4E-28	41	42	Peinf101Scf01482g10004.1	3E-28	41	42

**Anexo 1 Cont.** Entradas de menor orden en el tBLASTn de putativos ortólogos de la familia NAC asociados a la senescencia en *Petunia hybrida*. Los asteriscos indican proteínas de *Arabidopsis* con función reportada en senescencia. (P) indica secuencia parcial de *Petunia hybrida*.

<b><i>Arabidopsis thaliana</i></b>		<b><i>Petunia hybrida</i></b> transcriptoma (Villarino <i>et al.</i> , 2014)					
<b>Código AGI</b>	<b>Sinónimos</b>	<b>Mejor entrada</b>	<b>Entrada de menor orden</b>	<b>Sinonimo</b>	<b>e-value</b>	<b>Identidad (%)</b>	<b>Cobertura (%)</b>
At5g13180 (*)	ANAC083; NAC083; VNI2	comp11118_c0_seq1 (PhNAC106)	comp17685_c0_seq1	PhNAC108	2E-69	60	64
At5G64530	ANAC104	comp24829_c0_seq2 (PhNAC089)	comp209662_c0_seq1 (P)	PhNAC005	1E-55	71	60
At1g12260	ANAC007; NAC07; VND4	comp17026_c0_seq1 (PhNAC052)	comp199967_c0_seq1 (P)	PhNAC053	8E-108	83	45
At4g28530	ANAC074; NAC074	comp20998_c0_seq2 (PhNAC051)	comp20998_c0_seq1 (P)	PhNAC085	4E-81	72	46
At3g04060 (*)	ANAC046; NAC046	comp9709_c0_seq1 (PhNAC058)	comp520856_c0_seq1 (P)	PhNAC030	8E-68	65	47
At5G64060	ANAC103; NAC103	comp12410_c0_seq1 (PhNAC094)	comp33776_c0_seq1	PhNAC093	8E-72	59	51
At3g10500 (*)	ANAC053; NAC053; NTL4	comp26387_c0_seq2 (PhNAC50)	comp26387_c0_seq6	PhNAC096	4E-128	43	99
At3G49530	ANAC062; NAC062	comp32221_c0_seq1 (PhNAC23)	comp7749_c0_seq1	PhNAC059	2E-75	44	66

**Anexo 1 Cont.** Identificación por BLASTp de los putativos ortólogos de las secuencias PhNAC asociadas a la senescencia encontradas en *Petunia hybrida*, en el genoma de sus parentales *Petunia axillaris* y *Petunia inflata*. (P) indica secuencia parcial de *Petunia hybrida*.

<b><i>Petunia hybrida</i></b> transcriptoma (Villarino <i>et al.</i> , 2014)		<b><i>Petunia axillaris</i></b> genoma borrador (Bombarely <i>et al.</i> , 2016)				<b><i>Petunia inflata</i></b> genoma borrador (Bombarely <i>et al.</i> , 2016)			
Accesión	Nombre	Accesión	e-value	Identidad (%)	Cobertura (%)	Accesión	e-value	Identidad (%)	Cobertura (%)
comp33806_c0_seq1	PhNAC101	Peaxi162Scf00000g00481.1	0.0	100	82	Peinf101Scf00139g02023.1	0.0	93	100
comp30243_c0_seq1	PhNAC097	Peaxi162Scf00051g01410.1	0.0	100	100	Peinf101Scf02544g00007.1	0.0	99	100
comp16927_c0_seq1	PhNAC033	Peaxi162Scf00842g00211.1	0.0	100	100	Peinf101Scf00969g00014.1	0.0	94	100
comp559557_c0_seq1 (P)	PhNAC024	Peaxi162Scf00222g00624.1	7E-95	100	100	Peinf101Scf03525g00016.1	5E-95	100	100
comp11118_c0_seq1	PhNAC106	Peaxi162Scf00128g01627.1	E-172	96	100	Peinf101Scf00889g02030.1	E-173	98	100
comp24829_c0_seq2	PhNAC089	Peaxi162Scf00001g00044.1	E-116	96	100	Peinf101Scf00791g12003.1	E-118	96	100
comp27121_c0_seq1	PhNAC004	Peaxi162Scf00150g00001.1	E-149	63	94	Peinf101Scf00009g02007.1	0.0	98	100
comp102798_c0_seq1	PhNAC086	Peaxi162Scf00083g00915.1	0.0	98	100	Peinf101Scf01063g02013.1	0.0	96	100
comp22278_c0_seq3 (P)	PhNAC082	Peaxi162Scf00002g00720.1	0.0	96	100	Peinf101Scf00674g08021.1	E-130	97	79
comp17026_c0_seq1 (P)	PhNAC052	Peaxi162Scf00054g02213.1	0.0	96	98	Peinf101Scf00371g00015.1	0.0	86	100
comp20998_c0_seq2 (P)	PhNAC051	Peaxi162Scf00987g00110.1	0.0	100	100	Peinf101Scf00373g04007.1	E-155	97	79
comp89070_c0_seq1	PhNAC074	Peaxi162Scf00232g01126.1	0.0	100	100	Peinf101Scf00055g20009.1	0.0	98	100
comp9709_c0_seq1 (P)	PhNAC058	Peaxi162Scf00076g00071.1	0.0	99	100	Peinf101Scf02764g00025.1	0.0	92	91
comp22005_c0_seq3	PhNAC017	Peaxi162Scf00451g00625.1	0.0	87	100	Peinf101Scf00699g00016.1	0.0	97	100
comp22839_c0_seq1	PhNAC025	Peaxi162Scf00171g00619.1	0.0	100	100	Peinf101Scf05738g00029.1	E-180	99	100
comp18132_c0_seq1 (P)	PhNAC099	Peaxi162Scf00091g00074.1	E-118	71	100	Peinf101Scf01611g02014.1	3E-94	97	65
comp12410_c0_seq1 (P)	PhNAC094	Peaxi162Scf00589g00322.1	E-134	100	99	Peinf101Scf00652g08018.1	E-132	98	99
comp14368_c0_seq1	PhNAC105	Peaxi162Scf00226g00319.1	0.0	100	100	Peinf101Scf02631g05031.1	0.0	98	100
comp26387_c0_seq2	PhNAC050	Peaxi162Scf00253g00321.1	0.0	100	100	Peinf101Scf00809g02027.1	0.0	96	100
comp20693_c0_seq1	PhNAC095	Peaxi162Scf01105g00015.1	0.0	100	100	Peinf101Scf00735g00009.1	0.0	99	100
comp32221_c0_seq1	PhNAC023	Peaxi162Scf01447g00005.1	0.0	100	56	Peinf101Scf01482g10004.1	0.0	100	<b>56</b>
comp17685_c0_seq1	PhNAC108	Peaxi162Scf00516g00027.1	E-145	94	100	Peinf101Scf02664g00025.1	E-143	94	100
comp209662_c0_seq1 (P)	PhNAC005	Peaxi162Scf00152g01118.1	2E-87	98	100	Peinf101Scf00650g24031.1	2E-87	98	100
comp199967_c0_seq1 (P)	PhNAC053	Peaxi162Scf000241g00423.1	E-129	99	99	Peinf101Scf03555g00019.1	E-122	96	99
comp20998_c0_seq1 (P)	PhNAC085	Peaxi162Scf00624g00014.1	0.0	99	99	Peinf101Scf00879g16003.1	E-148	97	82
comp520856_c0_seq1 (P)	PhNAC030	Peaxi162Scf00274g00443.1	E-171	99	99	Peinf101Scf01556g09036.1	E-169	97	99
comp33776_c0_seq1	PhNAC093	Peaxi162Scf00583g00020.1	0.0	100	99	Peinf101Scf01353g01023.1	0.0	96	99
comp26387_c0_seq6	PhNAC096	Peaxi162Scf00176g01638.1	0.0	93	96	Peinf101Scf00269g04018.1	0.0	92	100
comp7749_c0_seq1	PhNAC059	Peaxi162Scf00815g00121.1	0.0	98	96	Peinf101Scf04519g02046.1	0.0	95	96

**Anexo 2.** Identificación por tBLASTn de putativos ortólogos de la familia WRKY asociados a la senescencia en *Petunia hybrida*, *Petunia axillaris* y *Petunia inflata* a partir de las 28 proteínas WRKY seleccionadas en Arabidopsis. Los asteriscos indican proteínas de Arabidopsis con función reportada en senescencia. (P) indica secuencia parcial de *Petunia hybrida*.

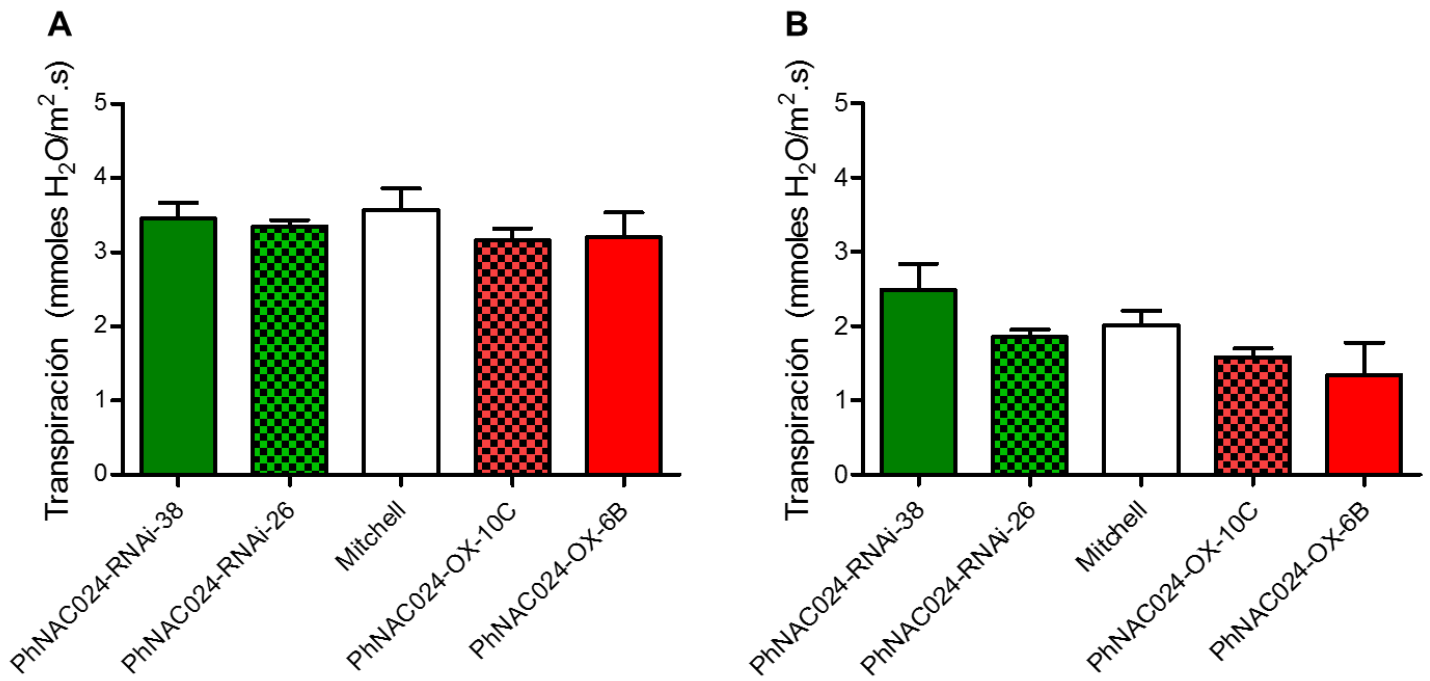
<b>Arabidopsis thaliana</b>		<b>Petunia hybrida</b> transcriptoma (Villarino <i>et al.</i> , 2014)					<b>Petunia axillaris</b> genoma borrador (Bombarely <i>et al.</i> , 2016)				<b>Petunia inflata</b> genoma borrador (Bombarely <i>et al.</i> , 2016)			
Código AGI	Sinónimos	Mejor entrada	Nombre	e-value	Identidad (%)	Cobertura (%)	Accesión	e-value	Identidad (%)	Cobertura (%)	Accesión	e-value	Identidad (%)	Cobertura (%)
AT4G26440	WRKY34	comp12645_c0_seq1	PhWRKY002	2,00E-126	50.96	76	Peaxi162Scf00232g00810.1	e-128	51	76	Peinf101Scf00055g17013.1	e-126	50.43	76
AT3G01970	WRKY45	comp23620_c0_seq2	PhWRKY075	3,00E-34	71.25	52	Peaxi162Scf00420g00640.1	6,00E-49	79	61	Peinf101Scf01192g04049.1	2,00E-49	79.12	61
AT5G13080 (*)	WRKY75	comp23620_c0_seq2	PhWRKY075	2,00E-53	89.01	62	Peaxi162Scf00420g00640.1	1,00E-49	79	62	Peinf101Scf01192g04049.1	4,00E-49	80.90	61
AT2G40740	WRKY55	comp15947_c0_seq2 (P)	PhWRKY055	2,00E-23	62.90	21	Peaxi162Scf00739g00429.1	2,00E-35	69	28	Peinf101Scf00339g01023.1	4,00E-38	65.66	33
AT4G31550	WRKY11	comp17118_c0_seq4	PhWRKY011	2,00E-90	49.85	99	Peaxi162Scf00459g00841.1	6,00E-96	52	96	Peinf101Scf00276g07026.1	e-101	53.37	96
AT3G58710	WRKY69	comp18538_c0_seq1 (P)	PhWRKY069	7,00E-48	70.19	38	Peaxi162Scf00202g00057.1	1,00E-68	44	95	Peinf101Scf00102g02002.1	2,00E-67	43.32	97
AT1G29280	WRKY65	comp18538_c0_seq1 (P)	PhWRKY069	5,00E-39	58.21	51	Peaxi162Scf00202g00057.1	7,00E-77	49	90	Peinf101Scf00102g02002.1	9,00E-78	48.73	90
AT2G23320	WRKY15	comp21369_c0_seq2	PhWRKY015	3,00E-71	48.41	93	Peaxi162Scf00549g00222.1	1,00E-91	50	100	Peinf101Scf00887g05031.1	5,00E-90	49.56	100
AT1G66600	WRKY63	comp21623_c0_seq1	PhWRKY063	9,00E-26	34.62	72	Peaxi162Scf00073g02335.1	5,00E-23	35	63	Peinf101Scf00782g02035.1	7,00E-27	34.62	72
AT2G40750 (*)	WRKY 54	comp933645_c0_seq1	PhWRKY054	1,00E-22	37.36	57	Peaxi162Scf00073g02339.1	8,00E-36	40	58	Peinf101Scf02687g00042.1	2,00E-34	36.82	65
AT3G01080	WRKY58	comp22104_c1_seq3	PhWRKY004	3,00E-79	49.37	69	Peaxi162Scf00222g00117.1	1,00E-94	40	95	Peinf101Scf00898g01016.1	2,00E-94	40.73	95
AT1G13960	WRKY4	comp22104_c1_seq3	PhWRKY004	1,00E-143	55.64	94	Peaxi162Scf00222g00117.1	e-172	56	96	Peinf101Scf00898g01016.1	e-171	55.62	96
AT2G03340	WRKY3	comp22104_c1_seq3	PhWRKY004	8,00E-137	52.30	96	Peaxi162Scf00222g00117.1	e-167	55	100	Peinf101Scf00898g01016.1	e-169	54.90	100
AT4G24240	WRKY7	comp22664_c0_seq2	PhWRKY007	1,00E-70	47.72	99	Peaxi162Scf00121g00018.1	e-101	50	99	Peinf101Scf01179g02021.1	2,00E-98	49.59	99
AT2G38470	WRKY33	comp23620_c0_seq3	PhWRKY033	2,00E-117	59.56	66	Peaxi162Scf00055g01910.1	e-129	51	87	Peinf101Scf00782g10028.1	e-128	49.70	87
AT5G64810	WRKY51	comp2525_c0_seq1 (P)	PhWRKY051	2,00E-35	71.95	42	Peaxi162Scf00160g01740.1	2,00E-37	44	90	Peinf101Scf02876g00007.1	2,00E-37	50.78	64
AT3G56400 (*)	WRKY70	comp26279_c1_seq2	PhWRKY070	2,00E-27	40.34	56	Peaxi162Scf00073g02335.1	1,00E-41	39	94	Peinf101Scf00191g46015.1	1,00E-40	37.37	94
AT5G49520	WRKY48	comp266655_c0_seq1 (P)	PhWRKY023	2,00E-45	51.79	46	Peaxi162Scf00164g01010.1	4,00E-57	42	80	Peinf101Scf00244g18025.1	3,00E-57	47.10	62
AT5G07100	WRKY26	comp30812_c0_seq1	PhWRKY024	7,00E-95	48.15	87	Peaxi162Scf00055g01910.1	7,00E-97	48	87	Peinf101Scf00450g00007.1	1,00E-96	47.18	87
AT2G30250	WRKY25	comp30812_c0_seq1	PhWRKY024	3,00E-87	41.56	98	Peaxi162Scf00055g01910.1	e-100	44	98	Peinf101Scf00450g00007.1	4,00E-99	44.39	98
AT4G18170	WRKY28	comp325234_c0_seq1	PhWRKY028	8,00E-56	56.47	51	Peaxi162Scf00111g00122.1	2,00E-59	45	91	Peinf101Scf00040g09006.1	8,00E-54	42.26	97
AT4G23810 (*)	WRKY53	comp42882_c0_seq1	PhWRKY053	3,00E-56	41.89	90	Peaxi162Scf00102g01741.1	1,00E-66	43	90	Peinf101Scf02382g03038.1	1,00E-66	43.14	90
AT5G15130	WRKY72	comp16919_c0_seq1	PhWRKY072	5,00E-34	60.53	21	Peaxi162Scf00059g00714.1	8,00E-87	44	78	Peinf101Scf00500g09036.1	3,00E-85	43.53	78
AT4G01720	WRKY47	comp6646_c0_seq1	PhWRKY006	9,00E-47	47.77	45	Peaxi162Scf00007g00315.1	1,00E-81	42	74	Peinf101Scf01579g02011.1	1,00E-81	42.19	74
AT1G18860	WRKY61	comp6646_c0_seq1	PhWRKY006	3,00E-41	68.82	19	Peaxi162Scf00013g00133.1	3,00E-69	41	100	Peinf101Scf00500g09036.1	5,00E-74	41.63	96
AT1G62300 (*)	WRKY6	comp6646_c0_seq1	PhWRKY006	5,00E-100	67.42	45	Peaxi162Scf00007g00315.1	e-151	54	83	Peinf101Scf01579g02011.1	e-149	52.92	87
AT1G69810	WRKY36	comp6646_c0_seq1	PhWRKY006	1,00E-34	50.00	39	Peaxi162Scf00007g00315.1	5,00E-48	35	86	Peinf101Scf00500g09036.1	8,00E-48	37.79	74
AT5G24110 (*)	WRKY30	comp730638_c0_seq1 (P)	PhWRKY030	1,00E-47	43.81	60	Peaxi162Scf00904g00212.1	9,00E-48	43	60	Peinf101Scf01632g03025.1	2,00E-48	44.08	60

**Anexo 2 Cont.** Identificación por BLASTp de los putativos ortólogos de las secuencias PhWRKY asociadas a la senescencia encontradas en *Petunia hybrida*, en el genoma de sus parentales *Petunia axillaris* y *Petunia inflata*. (P) indica secuencia parcial de *Petunia hybrida*

<b><i>Petunia hybrida</i></b> transcriptoma (Villarino <i>et al.</i> , 2014)		<b><i>Petunia axillaris</i></b> genoma borrador (Bombarely <i>et al.</i> , 2016)				<b><i>Petunia inflata</i></b> genoma borrador (Bombarely <i>et al.</i> , 2016)			
Mejor entrada	Nombre	Accesión	e-value	Identidad (%)	Cobertura (%)	Accesión	e-value	Identidad (%)	Cobertura (%)
comp6646c0seq1	PhWRKY006	Peaxi162Scf00007g00315.1	0.0	99.66	88	Peinf101Scf01579g02011.1	0.0	99.66	88
comp22664c0seq2	PhWRKY007	Peaxi162Scf00121g00018.1	0.0	100.00	100	Peinf101Scf01179g02021.1	0.0	97.36	100
comp12645c0seq2	PhWRKY002	Peaxi162Scf00232g00810.1	0.0	99.46	100	Peinf101Scf00055g17013.1	0.0	97.72	100
comp15947c0seq2	PhWRKY055	Peaxi162Scf00102g01741.1	e-114	68.70	99	Peinf101Scf00962g23035.1	e-164	92.12	99
comp16919c0seq1	PhWRKY072	Peaxi162Scf00178g01110.1	0.0	98.68	79	Peinf101Scf01200g03007.1	0.0	98.05	79
comp18538c0seq1	PhWRKY069	Peaxi162Scf00469g00624.1	e-109	99.48	97	Peinf101Scf00442g03028.1	5,00E-96	91.15	97
comp21623c0seq1	PhWRKY063	Peaxi162Scf00732g00236.1	0.0	98.67	100	Peinf101Scf00782g02035.1	0.0	93.51	100
comp23620c0seq3	PhWRKY033	Peaxi162Scf00744g00220.1	0.0	98.98	90	Peinf101Scf00782g10028.1	0.0	93.89	91
comp2525c0seq1	PhWRKY051	Peaxi162Scf00106g01616.1	1,00E-40	100.00	98	Peinf101Scf00381g17007.1	2,00E-39	98.44	98
comp266655c0seq1	PhWRKY023	Peaxi162Scf00164g01010.1	0.0	92.55	99	Peinf101Scf00244g18025.1	e-169	87.28	99
comp30812c0seq1	PhWRKY024	Peaxi162Scf00055g01910.1	0.0	100.00	100	Peinf101Scf00450g00007.1	0.0	97.53	100
comp325234c0seq1	PhWRKY028	Peaxi162Scf01189g00009.1	e-115	100.00	96	Peinf101Scf00040g09006.1	e-105	98.63	87
comp42882c0seq1	PhWRKY053	Peaxi162Scf00102g01741.1	0.0	100.00	100	Peinf101Scf02382g03038.1	0.0	100.00	100
comp730638c0seq1	PhWRKY030	Peaxi162Scf00904g00212.1	e-166	99.10	99	Peinf101Scf01632g03025.1	e-167	99.55	100
comp23620c0seq2	PhWRKY075	Peaxi162Scf00128g01541.1	1,00E-90	85.96	99	Peinf101Scf00889g03041.1	5,00E-83	87.64	99
comp17118c0seq4	PhWRKY011	Peaxi162Scf00459g00841.1	e-145	95.98	77	Peinf101Scf00276g07026.1	e-148	94.78	77
comp21369c0seq2	PhWRKY015	Peaxi162Scf00549g00222.1	0.0	99.05	100	Peinf101Scf00887g05031.1	0.0	99.05	100
comp933645c0seq1	PhWRKY054	Peaxi162Scf00304g00719.1	0.0	94.81	100	Peinf101Scf00339g02023.1	e-166	90.37	100
comp22104_c1_seq3	PhWRKY004	Peaxi162Scf00222g00117.1	0.0	85.07	100	Peinf101Scf00231g01029.1	0.0	81.62	89
comp26279_c1_seq2	PhWRKY070	Peaxi162Scf00073g02335.1	0.0	94.65	100	Peinf101Scf00191g46015.1	0.0	97.32	100



**Anexo 3.** Evaluación de la tasa de transpiración en hojas jóvenes y maduras de las líneas sobre-expresantes y de silenciamiento génico de *PhNAC024*. Las plantas fueron cultivadas en cámara de crecimiento con fotoperiodo largo y alta irradiancia (aprox.  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Las mediciones corresponden a hojas jóvenes recién expandidas (día 0 en relación a su máxima expansión) (A) y a hojas maduras (35 días en relación a su máxima expansión) (B) descritas en la Fig. 24. Los asteriscos indican diferencias significativas utilizando ANOVA de un factor seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras corresponden al error standard.



**Anexo 4.** Secuencias de oligonucleótidos utilizados y tamaño esperado de los productos de amplificación.

Accesión	Nombre	Primer forward	Primer reverse	Tamaño (pb)
<b>Genes de referencia (housekeeping)</b>				
comp12774_c0_seq1	<i>Ph18S rRNA</i>	TTTTAGGCCGCGGAAGTTTG	GTACAAAGGGCAGGGACGTA	237
comp28072_c0_seq2	<i>PhEF1a</i>	GACCAAGATTGACAGGCGATC	CTGACAGCAAACGACCCAATGG	153
<b>PhNACs</b>				
comp27121_c0_seq1	<i>PhNAC004</i>	CAACAACACAGCAGGATGACAG	CTACAAGTTCTTCTCAGTTGGATGG	151
comp209662_c0_seq1	<i>PhNAC005</i>	CACTAGGAGTTGATGAACCAATCTTG	GACACCTTCTGTTGGCTCACC	101
comp22005_c0_seq3	<i>PhNAC017</i>	TGAGGCAGGGTATTGGAAGGC	TTGGCAGTTTGAGGAAGGTTGTG	189
comp32221_c0_seq1	<i>PhNAC023</i>	TTAGATGATGCTGAACAGAATGCTAC	ACCTTTGGGAACTTTGCTGC	138
comp559557_c0_seq1	<i>PhNAC024</i>	AGACCATGTCCCCTTCAATTATCC	CCTGTAGCCTTCCAATAACCTGATA	182
comp22839_c0_seq1	<i>PhNAC025</i>	ACCTAGTAGTGTACCATCTTTGAGTATC	TTCGCCATGAAAGGGAGAAGTTG	187
comp520856_c0_seq1	<i>PhNAC030</i>	TTCATCACCATAATAACAGAACCAAAGC	AGAGAGCAGGGAATAGCAGAGG	143
comp16927_c0_seq1	<i>PhNAC033</i>	CAGTGGGAAAGCCAGGACCT	GGCTTGGCAGCAGAGCGGTGG	137
comp26387_c0_seq2	<i>PhNAC050</i>	ATGTGGAAAGCCTTTAAGAATTGATG	CCCGTTCTGTTGCTCGGTTGG	176
comp20998_c0_seq2	<i>PhNAC051</i>	CCACGGCTCCTGCTTTCTTC	AACCCAAATTCATCTTCTTTCCATAC	159
comp17026_c0_seq1	<i>PhNAC052</i>	CCACCTCATCATCATCAGCAATTTATTC	TCTTCAACTTGGTCATTGGCACTAC	200
comp199967_c0_seq1	<i>PhNAC053</i>	CGTGGACCTTACAAGATTGAACC	CCTGCTGCTGTTGCTCTATTGG	144
comp9709_c0_seq1	<i>PhNAC058</i>	AAGCATAGGAGCACGAAGAAGTC	CCATTAAGAGGAGCAGTGAAGAAGG	89
comp7749_c0_seq1	<i>PhNAC059</i>	GAAGGACTATCACTGTAAGTAGGAAC	ACTACAAGCAGGCTTAACACTACG	260
comp89070_c0_seq1	<i>PhNAC074</i>	CAGCAACTTCTTCTCGTGTGAC	GCCAGCGTTACTACTATTACCTTCC	92
comp22278_c0_seq3	<i>PhNAC082</i>	GGAAGCAATATGAACCAATGATACAG	TGGAGCAATTAGCAGCAGTTTC	181
comp20998_c0_seq1	<i>PhNAC085</i>	GTGAGAACATCAGCAGTAGTAAACATAC	GGAGAGCAGCGGCGGTAGC	143
comp102798_c0_seq1	<i>PhNAC086</i>	ATGCGTGAAGGCTGGGAGTC	TGGCTTCCATTTCTTCTTGG	155
comp24829_c0_seq2	<i>PhNAC089</i>	ATAGCCTTTCTGATTCTTCTTAGTTCTG	AAGTTCTGTGCCATCATCGTTGTC	152
comp33776_c0_seq1	<i>PhNAC093</i>	TCAGCAAGTAGTCAGCAAGTTTCAG	GCTTGTAAAGAACTAAAGTCAGAAGTGTATG	142
comp12410_c0_seq1	<i>PhNAC094</i>	TCGTGCTACTGAACTGGATACTG	CCCTTTGGCGGATGACCTC	120
comp20693_c0_seq1	<i>PhNAC095</i>	GAGGAGAGGCCAGAGGATGATGTG	GCAACGAATCGGGAATATCAAGAAG	110
comp26387_c0_seq6	<i>PhNAC096</i>	GCAATAGTGAGGAAACGGGCAAC	GCAAGTAGTCCACATCTCAGAGTTC	186
comp30243_c0_seq1	<i>PhNAC097</i>	ACCGCTACCACCTCAGCCTGC	GGTGAACCACATGTTCCGAGCAGC	126
comp18132_c0_seq1	<i>PhNAC099</i>	GGACAGAGGACACAATGGATAATGC	ACCAAATGAGAACTGAACTACTAATACCC	191
comp33806_c0_seq1	<i>PhNAC101</i>	CATCCACAATCACAAACAGCAACAAC	TTATCCCGCTTTCAACTTCTTCATCC	125
comp14368_c0_seq1	<i>PhNAC105</i>	ACAGTCAGGCACATCACAGTTG	CCAAGAAGGTCATCCATCTCCAG	135
comp11118_c0_seq1	<i>PhNAC106</i>	CCCACAATCAACAACACTCTG	GCTGCTGCTCTTGTACTTGTATTATTC	132
comp17685_c0_seq1	<i>PhNAC108</i>	GTTTCTTCATCTTCTTCTTCTTTG	ATGCTCTACTACACTACTTGGACTTG	81
<b>PhWRKYs</b>				
comp730638_c0_seq1	<i>PhWRKY030</i>	AATAATATGACTCCAACCGCACCTG	AGAATTTCCCGTGACACAGACATAAG	116
comp21623_c0_seq1	<i>PhWRKY063</i>	GCCATAAGTTCGCCTTCATCGG	TCCTTCTCTGTAGCATCCTCGTC	100
comp22104_c1_seq3	<i>PhWRKY004</i>	ACCATCAGCCGCCTCAACATAG	CAGCATCACCCACTTCTCACC	198
comp21369_c0_seq2	<i>PhWRKY015</i>	AGCAACAACATTCATCTTCCAGC	CCTCTCAGCCTTAACTTCTTCTC	200
comp12645_c0_seq2	<i>PhWRKY002</i>	AACCGCCACCGAACCCTAG	CAATCAAGACTCCAGCACCAG	151
comp23620_c0_seq2	<i>PhWRKY075</i>	GCCAAGAAGACAAGAAAGTACCAAAC	AACTATTATTATTGCTCTGAGTAACACCAC	111
comp18538_c0_seq1	<i>PhWRKY069</i>	ACCACCACCACCACCCTACTAC	CGGCGACGATGAATTGTCTTGC	146
comp30812_c0_seq1	<i>PhWRKY024</i>	ATTCACACCATCATCAACCACCAAG	TACAAGGATAATCATCAGAAGCAAGAAGG	81
comp16919_c0_seq1	<i>PhWRKY072</i>	AACCATCTCATTACATTCCTCATCAG	TCATAGTCGCTTCTGTTGCTTGC	192
comp6646_c0_seq1	<i>PhWRKY006</i>	CATTAGCAGCAGCCATCACTTCC	TTGTTGCTGCTGTTGTGGTAGC	94
comp2525_c0_seq1	<i>PhWRKY051</i>	GGTCAAGAAATAGTCCAATCCAAGG	GAGGGAATTGTGTAGTGAAGAAC	173
comp17118_c0_seq4	<i>PhWRKY011</i>	ACCTCCACCTCCACCCTACTAC	TCGCCTTCGCATTGAGATACC	110
comp22664_c0_seq2	<i>PhWRKY007</i>	TTTCAAATGTTTCATCTGCTGGTAGG	TTCTTAGGACAGTGGCAACGAC	136
comp325234_c0_seq1	<i>PhWRKY028</i>	CGTGTGGAGAGGTCATTTCAG	TGGTGAAGCAGCATGGAAGG	132
comp15947_c0_seq2	<i>PhWRKY055</i>	AGTCAGTGCCGAGAATGGATTTG	ACATCTGTAATAACTCCTGGGATATTTAGC	112
comp23620_c0_seq3	<i>PhWRKY033</i>	GAGAACAAGAGGCAGAAGATGGATAC	CGACTGAGGCTTTGGATGATTATGG	197
comp42882_c0_seq1	<i>PhWRKY053</i>	CTACAAGTAACATCACACAGAAACAAG	GGAGGAAAGGAGAAAGGACATATTGC	161
comp266655_c0_seq1	<i>PhWRKY023</i>	TGTCGTGTATCTTTCATCATCAACTG	TTAGGCTTAACTGTTTCTTACTTGTCTG	133
comp933645_c0_seq1	<i>PhWRKY054</i>	TCTGCGGTAAAGGATGGATATG	GCACCTGTAGTAGCACCTTGG	90
comp26279_c0_seq2	<i>PhWRKY070</i>	TTCAGAATGAGGAAGTTGACCAATC	CCTCCACGCACAACCATCC	185
<b>Genes asociados a la senescencia y a la biosíntesis de hormonas</b>				
comp28131_c1_seq10	<i>PhCAB2</i>	CGAGGGTGGACTTGACTTGGGCAACC	AGCTCAGCAAATGCCTCTGGGT	210
comp27346_c0_seq1	<i>PhSAG12</i>	TTGTTGGGCATTCTCAGCAGTAGC	TCCACAAGTGTGTTCCGATAAAGAGG	93
comp30663_c0_seq1	<i>PhSAG113</i>	CAGGCTTGAGAATAACGGAGAAGC	TGGCACTGTGGAGCTGTAGC	160
comp29949_c0_seq1	<i>PhPAO</i>	GCAACAGTGACAATCCAACGC	CTCTATCTCGCCTTCCAGTAACC	118
comp8457_c0_seq1	<i>PhSGR1</i>	GCAATCTCTCAAACCATCAATAATTCTCAG	GACATCTTCCCTTAACTTTCTTCCATTC	104
comp34864_c0_seq1	<i>PhNCED1</i>	GGTCTGCTCTGTGTTTCTTAAAG	CGGCAATCATCTTCCAGACATAGC	187
comp24359_c0_seq1	<i>PhACO1</i>	ACCGAGTGATGGCTGAGAAGG	GCTTTGATGCTGGAGAAATGATGG	93
comp11698_c0_seq1	<i>PhBFN1</i>	CCTCTCCACTTTCATTGATACACCAG	AGCAACACATATCCTTCACTCC	96
<b>Clonados Gateway</b>				
comp559557_c0_seq1	<i>PhNAC024-Gateway-OX</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGG CTATGTTGGAAAAATTAGCTCGGAC	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTTCACTGGAATTGAAAAGCTGGATTCC	923
comp22005_c0_seq3	<i>PhNAC017-Gateway-OX</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTA TGGAAAGATTACTTGAATATTGTAAC	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GGTTTAATAATTCCAGAGACAAATCAAGATCC	986



**Senescencia Natural de las Hojas**  
(Días en relación a la máxima)

**Senescencia Natural de los Pétalos**  
(Días desde la antesis)

**Senescencia Inducida por Polinización**

**PhNAC095**

P value = 0.0047

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.226	4.508	No	ns
-3 vs 11	-1.161	4.271	No	ns
-3 vs 18	-1.073	3.948	No	ns
-3 vs 25	-1.189	4.373	No	ns
-3 vs 33	-2.126	7.818	Yes	**

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	0.4167	1.682	No	ns
0 vs 6	0.7583	3.062	No	ns
0 vs 9	-1.54	6.218	Yes	**
0 vs 11	-2.167	8.748	Yes	***

P value = 0.0007

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	0.7467	4.211	No	ns
0 vs 24	0.59	3.328	No	ns
0 vs 48	-0.8417	4.747	Yes	*
0 vs 72	0.2022	1.141	No	ns

**PhNAC097**

P value = 0.0049

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-0.5789	2.753	No	ns
-3 vs 11	-0.7122	3.388	No	ns
-3 vs 18	-0.4617	2.196	No	ns
-3 vs 25	-0.6189	2.944	No	ns
-3 vs 33	-1.588	7.555	Yes	**

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-0.2533	1.226	No	ns
0 vs 6	-0.43	2.081	No	ns
0 vs 9	-1.463	7.08	Yes	**
0 vs 11	-2.293	11.1	Yes	***

P value = 0.9151

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-0.1844	0.9605	No	ns
0 vs 24	-0.1856	0.9663	No	ns
0 vs 48	-0.1833	0.9547	No	ns
0 vs 72	-0.03556	0.1852	No	ns

**PhNAC033**

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-0.7944	5.245	Yes	*
-3 vs 11	-1.399	9.236	Yes	***
-3 vs 18	-0.6533	4.313	No	ns
-3 vs 25	-1.422	9.39	Yes	***
-3 vs 33	-2.882	19.03	Yes	***

P value = 0.0034

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-0.4833	1.025	No	ns
0 vs 6	-0.3333	0.7069	No	ns
0 vs 9	-1.219	2.585	No	ns
0 vs 11	-3.348	7.101	Yes	**

P value = 0.5526

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-0.3111	1.249	No	ns
0 vs 24	-0.3233	1.298	No	ns
0 vs 48	-0.1	0.4014	No	ns
0 vs 72	0.2067	0.8296	No	ns

**PhNAC051**

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-0.3967	1.251	No	ns
-3 vs 11	-2.429	7.66	Yes	**
-3 vs 18	-2.592	8.173	Yes	***
-3 vs 25	-3.491	11.01	Yes	***
-3 vs 33	-2.781	8.771	Yes	***

P value = 0.0236

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	1.62	3.958	No	ns
0 vs 6	2.16	5.278	Yes	*
0 vs 9	2.097	5.123	Yes	*
0 vs 11	1.482	3.62	No	ns

P value = 0.0003

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	0.2167	1.357	No	ns
0 vs 24	0.2417	1.514	No	ns
0 vs 48	-0.9167	5.741	Yes	*
0 vs 72	-1.028	6.437	Yes	**

**PhNAC082**

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.818	6.865	Yes	**
-3 vs 11	-3.391	12.81	Yes	***
-3 vs 18	-2.69	10.16	Yes	***
-3 vs 25	-4.087	15.43	Yes	***
-3 vs 33	-3.656	13.81	Yes	***

P value = 0.1027

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	0.7356	1.657	No	ns
0 vs 6	0.555	1.251	No	ns
0 vs 9	-0.9855	2.221	No	ns
0 vs 11	0.6133	1.382	No	ns

P value = 0.3788

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-0.007778	0.01064	No	ns
0 vs 24	0.1189	0.1627	No	ns
0 vs 48	-1.452	1.777	No	ns
0 vs 72	0.02111	0.02889	No	ns

**PhNAC093**

P value = 0.0431

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-0.6144	4.404	No	ns
-3 vs 11	-0.6233	4.468	No	ns
-3 vs 18	-0.4167	2.986	No	ns
-3 vs 25	-0.5467	3.918	No	ns
-3 vs 33	-0.1989	1.425	No	ns

P value = 0.0363

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-0.9456	3.562	No	ns
0 vs 6	-0.6383	2.405	No	ns
0 vs 9	-0.6156	2.319	No	ns
0 vs 11	0.34	1.281	No	ns

P value = 0.0117

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-0.4156	3.632	No	ns
0 vs 24	-0.1589	1.389	No	ns
0 vs 48	-0.52	4.545	No	ns
0 vs 72	-0.6778	5.923	Yes	*

**PhNAC094**

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.124	9.764	Yes	***
-3 vs 11	-2.389	20.74	Yes	***
-3 vs 18	-1.912	16.6	Yes	***
-3 vs 25	-1.941	16.86	Yes	***
-3 vs 33	-1.92	16.67	Yes	***

P value = 0.0767

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-0.4022	2.763	No	ns
0 vs 6	-0.1883	1.294	No	ns
0 vs 9	-0.05111	0.3511	No	ns
0 vs 11	-0.595	4.088	No	ns

P value = 0.0002

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-0.3133	2.595	No	ns
0 vs 24	-0.2233	1.85	No	ns
0 vs 48	-1	8.282	Yes	**
0 vs 72	-1.073	8.89	Yes	***

**Senescencia Natural de las Hojas**  
(Días en relación a la máxima)

**Senescencia Natural de los Pétalos**  
(Días desde la antesis)

**Senescencia Inducida por Polinización**

PhNAC023

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.443	9.558	Yes	***
-3 vs 11	-1.48	9.8	Yes	***
-3 vs 18	-1.525	10.1	Yes	***
-3 vs 25	-1.872	12.4	Yes	***
-3 vs 33	-2.064	13.67	Yes	***

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-0.2511	4.235	No	ns
0 vs 6	-0.02462	0.4152	No	ns
0 vs 9	-0.63	10.63	Yes	***
0 vs 11	-0.6383	10.77	Yes	***

P value = 0.0003

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	0.4178	5.551	Yes	*
0 vs 24	0.68	9.036	Yes	***
0 vs 48	0.57	7.574	Yes	**
0 vs 72	0.7433	9.877	Yes	***

PhNAC096

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-0.9256	4.388	No	ns
-3 vs 11	-1.146	5.43	Yes	*
-3 vs 18	-1.26	5.973	Yes	*
-3 vs 25	-1.527	7.237	Yes	**
-3 vs 33	-2.649	12.56	Yes	***

P value = 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-0.04983	0.3514	No	ns
0 vs 6	0.15	1.058	No	ns
0 vs 9	0.1067	0.7521	No	ns
0 vs 11	-1.278	9.013	Yes	***

P value = 0.1860

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	0.3633	2.808	No	ns
0 vs 24	0.1325	1.024	No	ns
0 vs 48	-0.1062	0.8207	No	ns
0 vs 72	0.02	0.1546	No	ns

PhNAC105

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.321	8.926	Yes	***
-3 vs 11	-1.543	10.43	Yes	***
-3 vs 18	-1.358	9.178	Yes	***
-3 vs 25	-1.742	11.77	Yes	***
-3 vs 33	-2.086	14.09	Yes	***

P value = 0.0010

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-0.1867	1.314	No	ns
0 vs 6	-0.1167	0.8214	No	ns
0 vs 9	-0.8133	5.726	Yes	*
0 vs 11	-1.075	7.569	Yes	**

P value = 0.9756

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-0.02333	0.1119	No	ns
0 vs 24	0.01153	0.05533	No	ns
0 vs 48	-0.07778	0.3731	No	ns
0 vs 72	-0.1578	0.7569	No	ns

PhNAC024

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-0.4844	1.458	No	ns
-3 vs 11	-6.314	19	Yes	***
-3 vs 18	-7.717	23.22	Yes	***
-3 vs 25	-7.601	22.88	Yes	***
-3 vs 33	-11.06	33.3	Yes	***

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-1.938	5.213	Yes	*
0 vs 6	-1.94	5.219	Yes	*
0 vs 9	-6.433	17.31	Yes	***
0 vs 11	-7.765	20.89	Yes	***

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-2.489	8.705	Yes	***
0 vs 24	-2.067	7.229	Yes	**
0 vs 48	-3.56	12.45	Yes	***
0 vs 72	-3.349	11.71	Yes	***

PhNAC058

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	0.6233	1.628	No	ns
-3 vs 11	-0.5456	1.425	No	ns
-3 vs 18	-0.895	2.338	No	ns
-3 vs 25	-0.98	2.56	No	ns
-3 vs 33	-6.74	17.61	Yes	***

P value = 0.0002

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-0.07889	0.08173	No	ns
0 vs 6	1.032	1.069	No	ns
0 vs 9	-7.297	7.56	Yes	**
0 vs 11	-6.198	6.421	Yes	**

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	0.301	1.423	No	ns
0 vs 24	0.87	4.112	No	ns
0 vs 48	-0.6067	2.867	No	ns
0 vs 72	-1.622	7.665	Yes	**

PhNAC106

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.276	5.53	Yes	*
-3 vs 11	-1.794	7.78	Yes	**
-3 vs 18	-2.53	10.97	Yes	***
-3 vs 25	-1.35	5.853	Yes	*
-3 vs 33	-3.323	14.41	Yes	***

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-0.31	1.074	No	ns
0 vs 6	-1.608	5.572	Yes	*
0 vs 9	-6.863	23.78	Yes	***
0 vs 11	-8.633	29.91	Yes	***

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-1.33	3.196	No	ns
0 vs 24	-1.573	3.781	No	ns
0 vs 48	-5.609	13.48	Yes	***
0 vs 72	-5.917	14.22	Yes	***

PhNAC089

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.388	4.234	No	ns
-3 vs 11	-2.61	7.962	Yes	**
-3 vs 18	-2.095	6.391	Yes	**
-3 vs 25	-2.63	8.023	Yes	**
-3 vs 33	-4.252	12.97	Yes	***

P value = 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	0.3456	0.6738	No	ns
0 vs 6	-0.8017	1.563	No	ns
0 vs 9	-4.082	7.959	Yes	**
0 vs 11	-4.047	7.891	Yes	**

P value = 0.0030

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-1.89	6.027	Yes	*
0 vs 24	-1.738	5.54	No	ns
0 vs 48	-3.433	10.95	Yes	**
0 vs 72	-3.257	10.39	Yes	**

**Senescencia Natural de las Hojas**  
(Días en relacion a la máxima)

**Senescencia Natural de los Pétalos**  
(Días desde la antesis)

**Senescencia Inducida por Polinización**

PhNAC017

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-2.748	12.41	Yes	***
-3 vs 11	-4.058	18.32	Yes	***
-3 vs 18	-3.918	17.69	Yes	***
-3 vs 25	-3.941	17.8	Yes	***
-3 vs 33	-4.042	18.25	Yes	***

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	0.2811	0.6535	No	ns
0 vs 6	0.3583	0.833	No	ns
0 vs 9	-5.052	11.74	Yes	***
0 vs 11	-5.47	12.72	Yes	***

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	0.1633	0.4706	No	ns
0 vs 24	0.5078	1.463	No	ns
0 vs 48	-4.342	12.51	Yes	***
0 vs 72	-4.4	12.68	Yes	***

PhNAC074

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.76	5.715	Yes	*
-3 vs 11	-4.13	13.41	Yes	***
-3 vs 18	-5.555	18.04	Yes	***
-3 vs 25	-3.983	12.93	Yes	***
-3 vs 33	-5.929	19.25	Yes	***

P value = 0.0136

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-0.97	1.982	No	ns
0 vs 6	-0.465	0.9504	No	ns
0 vs 9	-2.024	4.138	No	ns
0 vs 11	-2.788	5.699	Yes	*

P value = 0.0008

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-1.321	6.722	Yes	**
0 vs 24	-0.8433	4.291	No	ns
0 vs 48	-1.672	8.505	Yes	***
0 vs 72	-1.514	7.705	Yes	**

PhNAC101

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-2.24	8.375	Yes	***
-3 vs 11	-4.467	16.7	Yes	***
-3 vs 18	-5.358	20.03	Yes	***
-3 vs 25	-4.401	16.46	Yes	***
-3 vs 33	-6.767	25.3	Yes	***

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-0.06556	0.1986	No	ns
0 vs 6	-0.3367	1.02	No	ns
0 vs 9	-2.718	8.233	Yes	**
0 vs 11	-4.293	13.01	Yes	***

P value = 0.0009

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-0.8056	4.139	No	ns
0 vs 24	-0.4578	2.352	No	ns
0 vs 48	-1.476	7.581	Yes	**
0 vs 72	-1.538	7.901	Yes	**

**Senescencia Natural de las Hojas**  
(Días en relación a la máxima expansión)

**Senescencia Natural de los Pétalos**  
(Días desde la antesis)

**Senescencia Inducida por Polinización**  
(Horas desde la polinización)

PhWRKY063				
P value < 0.0001				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.643	3.459	No	ns
-3 vs 11	-3.434	7.229	Yes	***
-3 vs 18	-4.672	9.833	Yes	***
-3 vs 25	-5.356	11.27	Yes	***
-3 vs 33	-5.017	10.56	Yes	***

PhWRKY063				
P value = 0.0032				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-2.077	2.852	No	ns
0 vs 6	-1.51	2.074	No	ns
0 vs 9	-2.361	3.242	No	ns
0 vs 11	-4.113	5.649	Yes	**

PhWRKY063				
P value = 0.0014				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	0.69	2.486	No	ns
0 vs 24	-0.2064	0.7435	No	ns
0 vs 48	-1.078	3.885	Yes	*
0 vs 72	-0.2817	1.015	No	ns

PhWRKY030				
P value < 0.0001				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.118	2.05	No	ns
-3 vs 11	-0.825	1.513	No	ns
-3 vs 18	-2.868	5.26	Yes	**
-3 vs 25	-4.999	9.166	Yes	***
-3 vs 33	-4.548	8.339	Yes	***

PhWRKY030				
P value < 0.0001				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-4.929	6.601	Yes	***
0 vs 6	-6.54	8.759	Yes	***
0 vs 9	-6.382	8.548	Yes	***
0 vs 11	-7.538	10.1	Yes	***

PhWRKY030				
ND				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary

PhWRKY028				
P value < 0.0001				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-2.33	4.822	Yes	**
-3 vs 11	-3.382	6.999	Yes	***
-3 vs 18	-4.068	8.419	Yes	***
-3 vs 25	-5.491	11.36	Yes	***
-3 vs 33	-6.22	12.87	Yes	***

PhWRKY028				
P value = 0.0017				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-2.93	2.57	No	ns
0 vs 6	-2.93	2.57	No	ns
0 vs 9	-3.623	3.178	No	ns
0 vs 11	-7.07	6.201	Yes	**

PhWRKY028				
P value = 0.0002				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	1.246	2.155	No	ns
0 vs 24	-2.013	3.483	No	ns
0 vs 48	-2.236	3.868	Yes	*
0 vs 72	-2.714	4.696	Yes	**

PhWRKY002				
P value = 0.0081				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-0.7689	1.995	No	ns
-3 vs 11	-1.486	3.855	Yes	*
-3 vs 18	-1.262	3.274	No	ns
-3 vs 25	-1.723	4.472	Yes	*
-3 vs 33	-1.427	3.702	Yes	*

PhWRKY002				
P value = 0.0007				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	0.2778	0.9339	No	ns
0 vs 6	0.5233	1.759	No	ns
0 vs 9	1.141	3.834	Yes	*
0 vs 11	-0.8733	2.936	No	ns

PhWRKY002				
P value < 0.0001				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-0.63	5.491	Yes	**
0 vs 24	-0.5311	4.629	Yes	**
0 vs 48	-0.5256	4.581	Yes	*
0 vs 72	-1.258	10.97	Yes	***

PhWRKY033				
P value < 0.0001				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.773	2.439	No	ns
-3 vs 11	-2.774	3.816	Yes	*
-3 vs 18	-3.98	5.474	Yes	**
-3 vs 25	-5.832	8.022	Yes	***
-3 vs 33	-7.302	10.04	Yes	***

PhWRKY033				
P value = 0.0014				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-1.644	1.843	No	ns
0 vs 6	-2.875	3.222	No	ns
0 vs 9	-2.796	3.133	No	ns
0 vs 11	-5.538	6.206	Yes	**

PhWRKY033				
P value = 0.0006				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-1.046	2.264	No	ns
0 vs 24	-2.767	5.992	Yes	**
0 vs 48	-2.664	5.771	Yes	**
0 vs 72	-1.422	3.079	No	ns

PhWRKY004				
P value = 0.0265				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-0.8289	2.995	No	ns
-3 vs 11	-0.8122	2.935	No	ns
-3 vs 18	-0.4517	1.632	No	ns
-3 vs 25	-0.9867	3.566	No	ns
-3 vs 33	-0.9689	3.501	No	ns

PhWRKY004				
P value = 0.0005				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-0.4078	1.316	No	ns
0 vs 6	-0.2083	0.6726	No	ns
0 vs 9	-1.458	4.708	Yes	**
0 vs 11	-1.828	5.903	Yes	**

PhWRKY004				
P value = 0.0004				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-0.1883	1.872	No	ns
0 vs 24	-0.2033	2.021	No	ns
0 vs 48	-0.3225	3.205	No	ns
0 vs 72	-0.7275	7.23	Yes	***

PhWRKY053				
P value < 0.0001				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-0.6533	2.01	No	ns
-3 vs 11	-0.48	1.477	No	ns
-3 vs 18	-1.128	3.471	No	ns
-3 vs 25	-2.972	9.143	Yes	***
-3 vs 33	-1.713	5.271	Yes	**

PhWRKY053				
P value= 0.0055				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-2.858	3.382	No	ns
0 vs 6	-2.737	3.239	No	ns
0 vs 9	-3.544	4.195	Yes	*
0 vs 11	-4.171	4.936	Yes	**

PhWRKY053				
P value= 0.0009				
Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	3.866	6.426	Yes	***
0 vs 24	2.109	3.506	No	ns
0 vs 48	1.714	2.85	No	ns
0 vs 72	3.001	4.989	Yes	**

**Senescencia Natural de las Hojas**  
(Días en relación a la máxima expansión)

**Senescencia Natural de los Pétalos**  
(Días desde la antesis)

**Senescencia Inducida por Polinización**  
(Horas desde la polinización)

PhWRKY006

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-0.8889	2.516	No	ns
-3 vs 11	-1.91	5.407	Yes	**
-3 vs 18	-2.625	7.431	Yes	***
-3 vs 25	-3.561	10.08	Yes	***
-3 vs 33	-4.518	12.79	Yes	***

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-1.44	3.396	No	ns
0 vs 6	-1.65	3.891	Yes	*
0 vs 9	-3.125	7.37	Yes	***
0 vs 11	-3.53	8.325	Yes	***

P value = 0.0051

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-1.227	3.454	No	ns
0 vs 24	-1.477	4.157	Yes	*
0 vs 48	-1.719	4.839	Yes	**
0 vs 72	-1.439	4.051	Yes	*

PhWRKY055

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.516	4.625	Yes	**
-3 vs 11	-1.535	4.685	Yes	**
-3 vs 18	-1.105	3.372	No	ns
-3 vs 25	-3.172	9.68	Yes	***
-3 vs 33	-2.777	8.474	Yes	***

P value = 0.001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-2.888	3.764	Yes	*
0 vs 6	-2.665	3.473	No	ns
0 vs 9	-3.677	4.792	Yes	**
0 vs 11	-4.942	6.441	Yes	***

ND

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary

PhWRKY007

P value = 0.7757

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	0.3	0.5854	No	ns
-3 vs 11	0.2444	0.477	No	ns
-3 vs 18	0.6717	1.311	No	ns
-3 vs 25	0.08333	0.1626	No	ns
-3 vs 33	0.5133	1.002	No	ns

P value = 0.0002

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	0.9789	3.291	No	ns
0 vs 6	1.372	4.611	Yes	**
0 vs 9	-0.59	1.984	No	ns
0 vs 11	-0.4567	1.535	No	ns

P value = 0.0025

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	0.1722	0.9992	No	ns
0 vs 24	0.2589	1.502	No	ns
0 vs 48	-0.6433	3.733	Yes	*
0 vs 72	-0.2367	1.373	No	ns

PhWRKY072

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.764	4.679	Yes	**
-3 vs 11	-3.503	9.291	Yes	***
-3 vs 18	-4.495	11.92	Yes	***
-3 vs 25	-4.859	12.89	Yes	***
-3 vs 33	-7.232	19.18	Yes	***

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-1.081	1.759	No	ns
0 vs 6	-0.9767	1.589	No	ns
0 vs 9	-5.725	9.316	Yes	***
0 vs 11	-7.037	11.45	Yes	***

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	-1.019	3.953	Yes	*
0 vs 24	-1.001	3.884	Yes	*
0 vs 48	-3.035	11.77	Yes	***
0 vs 72	-3.445	13.37	Yes	***

PhWRKY069

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.671	4.168	Yes	*
-3 vs 11	-2.036	5.077	Yes	**
-3 vs 18	-1.818	4.535	Yes	*
-3 vs 25	-3.034	7.568	Yes	***
-3 vs 33	-3.62	9.028	Yes	***

ND

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary

One-way  $\epsilon$  ND

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary

PhWRKY024

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-0.4189	0.9588	No	ns
-3 vs 11	-2.548	5.832	Yes	**
-3 vs 18	-2.895	6.626	Yes	***
-3 vs 25	-2.951	6.755	Yes	***
-3 vs 33	-4.741	10.85	Yes	***

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	0.6244	1.068	No	ns
0 vs 6	0.67	1.146	No	ns
0 vs 9	-3.393	5.802	Yes	**
0 vs 11	-4.33	7.404	Yes	***

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	2.303	10.06	Yes	***
0 vs 24	2.06	9	Yes	***
0 vs 48	0.81	3.539	No	ns
0 vs 72	1.202	5.25	Yes	**

PhWRKY075

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-0.8767	1.328	No	ns
-3 vs 11	0.6232	0.9437	No	ns
-3 vs 18	-1.862	2.819	No	ns
-3 vs 25	-3.263	4.942	Yes	*
-3 vs 33	-6.538	9.9	Yes	***

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-0.9867	0.9103	No	ns
0 vs 6	-5.078	4.685	Yes	**
0 vs 9	-7.228	6.669	Yes	***
0 vs 11	-7.768	7.167	Yes	***

ND

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary



**Senescencia Natural de las Hojas**  
(Días en relación a la máxima expansión)

**Senescencia Natural de los Pétalos**  
(Días desde la antesis)

**Senescencia Inducida por Polinización**  
(Horas desde la polinización)

PhWRKY015

P value = 0.0076

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-0.3878	1.001	No	ns
-3 vs 11	-0.2389	0.6168	No	ns
-3 vs 18	-0.47	1.214	No	ns
-3 vs 25	-0.4433	1.145	No	ns
-3 vs 33	-1.816	4.688	Yes	**

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-1.093	2.199	No	ns
0 vs 6	-1.508	3.033	No	ns
0 vs 9	-4.147	8.338	Yes	***
0 vs 11	-4.835	9.723	Yes	***

P value = 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	0.2867	1.049	No	ns
0 vs 24	-0.2157	0.7893	No	ns
0 vs 48	-1.725	6.312	Yes	***
0 vs 72	-1.18	4.318	Yes	*

PhWRKY054

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-1.53	3.439	No	ns
-3 vs 11	-3.15	7.08	Yes	**
-3 vs 18	-4.142	9.309	Yes	***
-3 vs 25	-5.064	11.38	Yes	***
-3 vs 33	-4.968	11.17	Yes	***

ND

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary

ND

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary

PhWRKY070

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
-3 vs 4	-0.6511	1.862	No	ns
-3 vs 11	-2.063	5.901	Yes	*
-3 vs 18	-2.595	7.422	Yes	**
-3 vs 25	-3.751	10.73	Yes	***
-3 vs 33	-3.142	8.987	Yes	***

P value = 0.0069

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 3	-0.8411	1.267	No	ns
0 vs 6	-1.272	1.915	No	ns
0 vs 9	-1.69	2.545	No	ns
0 vs 11	-3.282	4.942	Yes	**

P value < 0.0001

Tukey's Test	Mean Diff.	q	P < 0.05?	Summary
0 vs 6	1.838	8.552	Yes	***
0 vs 24	0.6867	3.195	No	ns
0 vs 48	0.4911	2.285	No	ns
0 vs 72	2.916	13.57	Yes	***

## BIBLIOGRAFÍA

- Abascal, Federico, Rafael Zardoya, and David Posada. 2005. "ProtTest: Selection of Best-Fit Models of Protein Evolution." *Bioinformatics* 21(9):2104–5.
- Ali, Akhtar, Xiaoming Gao, and Yongfeng Guo. 2018. "Initiation, Progression, and Genetic Manipulation of Leaf Senescence." *Methods in Molecular Biology* 1744:9–31.
- Allu, Annapurna Devi, Aleksandra Maria Soja, Anhui Wu, Jędrzej Szymanski, and Salma Balazadeh. 2014. "Salt Stress and Senescence: Identification of Cross-Talk Regulatory Components." *Journal of Experimental Botany* 65(14):3993–4008.
- Alonso, Jose M., Takashi Hirayama, Gregg Roman, Saeid Nourizadeh, and Joseph R. Ecker. 1999. "EIN2, a Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Responses in Arabidopsis." *Science* 284(5423):2148–52.
- Argueso, Cristiana T., Tracy Raines, and Joseph J. Kieber. 2010. "Cytokinin Signaling and Transcriptional Networks." *Current Opinion in Plant Biology* 13(5):533–39.
- Bailey, Timothy L., Mikael Boden, Fabian A. Buske, Martin Frith, Charles E. Grant, Luca Clementi, Jingyuan Ren, Wilfred W. Li, and William S. Noble. 2009. "MEME SUITE: Tools for Motif Discovery and Searching." *Nucleic Acids Research* 37(Web Server issue):W202-8.
- Balazadeh, S., D. M. Riaño-Pachón, and B. Mueller-Roeber. 2008. "Transcription Factors Regulating Leaf Senescence in Arabidopsis Thaliana." *Plant Biology* 10(SUPPL. 1):63–75.
- Balazadeh, Salma, Mirosław Kwasniewski, Camila Caldana, Mohammad Mehrnia, María Inés Zanor, Gang-Ping Ping Xue, and Bernd Mueller-Roeber. 2011. "ORS1, an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Responsive NAC Transcription Factor, Controls Senescence in Arabidopsis Thaliana." *Molecular Plant* 4(2):346–60.
- Balazadeh, Salma, Hamad Siddiqui, Annapurna D. Allu, Lilian P. Matallana-Ramirez, Camila Caldana, Mohammad Mehrnia, Maria Inés Zanor, Barbara Köhler, and Bernd Mueller-Roeber. 2010. "A Gene Regulatory Network Controlled by the NAC Transcription Factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during Salt-Promoted Senescence." *Plant Journal* 62(2):250–64.
- Bartoli, Carlos G., Claudia A. Casalougué, Marcela Simontacchi, Belen Marquez-Garcia, and Christine H. Foyer. 2013. "Interactions between Hormone and Redox Signalling Pathways in the Control of Growth and Cross Tolerance to Stress." *Environmental and Experimental Botany* 94:73–88.
- Benedetti, Celso Eduardo and Paulo Arruda. 2002. "Altering the Expression of the Chlorophyllase Gene *ATHCOR1* in Transgenic Arabidopsis Caused Changes in the Chlorophyll-to-Chlorophyllide Ratio." *Plant Physiology* 128(4):1255–63.
- Besseau, Sébastien, Jing Li, and E. Tapio Palva. 2012. "WRKY54 and WRKY70 Co-Operate as Negative Regulators of Leaf Senescence in Arabidopsis Thaliana." *Journal of Experimental Botany* 63(7):2667–79.
- Bisson, Melanie M. A., Andrea Bleckmann, Silke Allekotte, and Georg Groth. 2009. "EIN2, the Central Regulator of Ethylene Signalling, Is Localized at the ER Membrane Where It Interacts with the Ethylene Receptor ETR1." *Biochemical Journal* 424(1):1–6.
- Bombarely, Aureliano, Michel Moser, Avichai Amrad, Manzhou Bao, Laure Bapaume, Cornelius S. Barry, Mattijs Blik, Maaïke R. Boersma, Lorenzo Borghi, Rémy Bruggmann, Marcel Bucher, Nunzio D'Agostino, Kevin Davies, Uwe Druege, Natalia Dudareva, Marcos Egea-Cortines, Massimo Delledonne, Noe Fernandez-Pozo, Philipp Franken, Laurie Grandont, J. S. Heslop-Harrison, Jennifer Hintzsche, Mitrick Johns, Ronald Koes, Xiaodan Lv, Eric Lyons, Diwa Malla, Enrico Martinoia, Neil S. Mattson, Patrice Morel, Lukas A. Mueller, Joëlle Muhlemann, Eva Nouri, Valentina Passeri, Mario Pezzotti, Qinzhou Qi, Didier Reinhardt, Melanie Rich, Katja R. Richert-Pöggeler, Tim P. Robbins, Michael C. Schatz, M. Eric Schranz, Robert C. Schuurink, Trude Schwarzacher, Kees Spelt, Haibao Tang, Susan L. Urbanus, Michiel Vandenbussche, Kitty Vijverberg, Gonzalo H. Villarino, Ryan M. Warner, Julia Weiss, Zhen Yue, Jan Zethof, Francesca Quattrocchio, Thomas L. Sims, and Cris Kuhlemeier. 2016. "Insight into the Evolution of the Solanaceae from the Parental Genomes of *Petunia Hybrida*." *Nature Plants* 2(May):1–9.
- Borrill, Philippa, Sophie A. Harrington, James Simmonds, Cristobal Uauy, Authors Philippa Borrill, Sophie A. Harrington, James Simmonds, and Cristobal Uauy. 2019. "Identification of Transcription Factors Regulating Senescence in Wheat through Gene Regulatory Network Modelling." *Plant Physiology*

180(3):1740–55.

- Borrill, Philippa, Sophie A. Harrington, and Cristobal Uauy. 2017. "Genome-Wide Sequence and Expression Analysis of the NAC Transcription Factor Family in Polyploid Wheat." *G3: Genes, Genomes, Genetics* 7(9):3019–29.
- Breeze, E., E. Harrison, S. McHattie, L. Hughes, R. Hickman, C. Hill, S. Kiddle, Y. -s. Kim, C. A. Penfold, D. Jenkins, C. Zhang, K. Morris, C. Jenner, S. Jackson, B. Thomas, A. Tabrett, R. Legaie, J. D. Moore, D. L. Wild, S. Ott, D. Rand, J. Beynon, K. Denby, A. Mead, and V. Buchanan-Wollaston. 2011. "High-Resolution Temporal Profiling of Transcripts during Arabidopsis Leaf Senescence Reveals a Distinct Chronology of Processes and Regulation." *The Plant Cell* 23(3):873–94.
- Broderick, Shaun R. and Michelle L. Jones. 2014. "An Optimized Protocol to Increase Virus-Induced Gene Silencing Efficiency and Minimize Viral Symptoms in Petunia." *Plant Molecular Biology Reporter* 32(1):219–33.
- Broderick, Shaun R., Saranga Wijeratne, Asela J. Wijeratn, Laura J. Chapin, Tea Meulia, and Michelle L. Jones. 2014. "RNA-Sequencing Reveals Early, Dynamic Transcriptome Changes in the Corollas of Pollinated Petunias." *BMC Plant Biology* 14(1):1–21.
- Brooks, C., V. Nekrasov, Z. B. Lippman, and J. Van Eck. 2014. "Efficient Gene Editing in Tomato in the First Generation Using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 System." *Plant Physiology* 166(3):1292–97.
- Bruinsma, Maaïke, Nicole M. Van Dam, Joop J. A. Van Loon, and Marcel Dicke. 2007. "Jasmonic Acid-Induced Changes in Brassica Oleracea Affect Oviposition Preference of Two Specialist Herbivores." *Journal of Chemical Ecology* 33(4):655–68.
- Brunetti, Cecilia, Federico Sebastiani, and Massimiliano Tattini. 2019. "Review: ABA, Flavonols, and the Evolvability of Land Plants." *Plant Science* 280:448–54.
- Buchanan-Wollaston, Vicky, Simon Earl, Elizabeth Harrison, Evy Mathas, Saeid Navabpour, Tania Page, and David Pink. 2002. "The Molecular Analysis of Leaf Senescence - a Genomics Approach." *Plant Biotechnology Journal* 1(1):3–22.
- Buchanan-Wollaston, Vicky, Simon Earl, Elizabeth Harrison, Evy Mathas, Saeid Navabpour, Tania Page, and David Pink. 2003. "The Molecular Analysis of Leaf Senescence--a Genomics Approach." *Plant Biotechnology Journal* 1(1):3–22.
- Buchanan-Wollaston, Vicky, Tania Page, Elizabeth Harrison, Emily Breeze, Ok Lim Pyung, Gil Nam Hong, Ji Feng Lin, Shu Hsing Wu, Jodi Swidzinski, Kimitsune Ishizaki, and Christopher J. Leaver. 2005. "Comparative Transcriptome Analysis Reveals Significant Differences in Gene Expression and Signalling Pathways between Developmental and Dark/Starvation-Induced Senescence in Arabidopsis." *Plant Journal* 42(4):567–85.
- Buet, Agustina, M. Lorenza Costa, Dana E. Martínez, and Juan J. Guiamet. 2019. "Chloroplast Protein Degradation in Senescing Leaves: Proteases and Lytic Compartments." *Frontiers in Plant Science* 10(June):747.
- Bustin, Stephen A., Jean François Beaulieu, Jim Huggett, Rolf Jaggi, Frederick S. B. Kibenge, Pål A. Olsvik, Louis C. Penning, and Stefan Toegel. 2010. "MIQE Précis: Practical Implementation of Minimum Standard Guidelines for Fluorescence-Based Quantitative Real-Time PCR Experiments." *BMC Molecular Biology* 11(1):74.
- Butt, Adrian, Claudia Mousley, Karl Morris, Jim Beynon, Canan Can, Eric Holub, Jean T. Greenberg, and Vicky Buchanan-Wollaston. 1998. "Differential Expression of a Senescence-Enhanced Metallothionein Gene In Arabidopsis in Response to Isolates Of Peronospora Parasitica and Pseudomonas Syringae." *The Plant Journal* 16(2):209–21.
- Cao, Zhe, Yufang Guo, Qian Yang, Yanhong He, Mohammed I. Fetouh, Ryan M. Warner, and Zhanao Deng. 2018. "Genome-Wide Search for Quantitative Trait Loci Controlling Important Plant and Flower Traits in Petunia Using an Interspecific Recombinant Inbred Population of Petunia Axillaris and Petunia Exserta ." *G3 &#58; Genes|Genomes|Genetics* 8(7):2309–17.
- Chang, Hsiang, Michelle L. Jones, Gary M. Banowetz, and David G. Clark. 2003. "Overproduction of Cytokinins in Petunia Flowers Transformed with P." *Society* 132(August):2174–83.

- Chang, Xiaoxiao, Linda Donnelly, Daoyang Sun, Jingping Rao, Michael S. Reid, and Cai Zhong Jiang. 2014. "A Petunia Homeodomain-Leucine Zipper Protein, PhHD-Zip, Plays an Important Role in Flower Senescence." *PLoS ONE* 9(2):1–10.
- Chapin, L. and M. Jones. 2007. "NUTRIENT REMOBILIZATION DURING POLLINATION-INDUCED COROLLA SENESCENCE IN PETUNIA." *Acta Horticulturae* 755(755):181–90.
- Chen, Daoqian, Shiwen Wang, Binglin Xiong, Beibei Cao, and Xiping Deng. 2015. "Carbon/Nitrogen Imbalance Associated with Drought-Induced Leaf Senescence in Sorghum Bicolor" edited by F. M. DaMatta. *PLOS ONE* 10(8):e0137026.
- Chen, Li Qing, Xiao Qing Qu, Bi Huei Hou, Davide Sosso, Sonia Osorio, Alisdair R. Fernie, and Wolf B. Frommer. 2012. "Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport." *Science* 335(6065):207–11.
- Chen, Ligang, Shengyuan Xiang, Yanli Chen, Daibo Li, and Diqiu Yu. 2017. "Arabidopsis WRKY45 Interacts with the DELLA Protein RGL1 to Positively Regulate Age-Triggered Leaf Senescence." *Molecular Plant* 10(9):1174–89.
- Chen, Mingxun, Antony Maodzeka, Longhua Zhou, Essa Ali, Zhong Wang, and Lixi Jiang. 2014. "Removal of DELLA Repression Promotes Leaf Senescence in Arabidopsis." *Plant Science* 219–220:26–34.
- Chen, Xu, Yaofeng Wang, Bo Lv, Jie Li, Liqiong Luo, Songchong Lu, Xuan Zhang, Hong Ma, and Feng Ming. 2014. "The NAC Family Transcription Factor OsNAP Confers Abiotic Stress Response through the ABA Pathway." *Plant and Cell Physiology* 55(3):604–19.
- Chen, Zhi Hui, Robert P. Walker, Richard M. Acheson, László I. Técsi, Astrid Wingler, Peter J. Lea, and Richard C. Leegood. 2000. "Are Isocitrate Lyase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Involved in Gluconeogenesis During Senescence of Barley Leaves and Cucumber Cotyledons?" *Plant and Cell Physiology* 41(8):960–67.
- Christiansen, Michael W. and Per L. Gregersen. 2014. "Members of the Barley NAC Transcription Factor Gene Family Show Differential Co-Regulation with Senescence-Associated Genes during Senescence of Flag Leaves." *Journal of Experimental Botany* 65(14):4009–22.
- Christiansen, Michael W., Preben B. Holm, and Per L. Gregersen. 2011. "Characterization of Barley (*Hordeum vulgare* L.) NAC Transcription Factors Suggests Conserved Functions Compared to Both Monocots and Dicots." *BMC Research Notes* 4:1–13.
- Christiansen, Michael W., Colette Matthewman, Dagmara Podzimaska-Sroka, Charlotte O'Shea, Søren Lindemose, Niels Erik Møllegaard, Inger B. Holme, Kim Hebelstrup, Karen Skriver, and Per L. Gregersen. 2016. "Barley Plants Over-Expressing the NAC Transcription Factor Gene HvNAC005 Show Stunting and Delay in Development Combined with Early Senescence." *Journal of Experimental Botany* 67(17):5259–73.
- Chuck, George, A. Mark Cigan, Koy Saeteurn, and Sarah Hake. 2007. "The Heterochronic Maize Mutant *Corngrass1* Results from Overexpression of a Tandem MicroRNA." *Nature Genetics* 39(4):544–49.
- Clark, D. G., C. Richards, Z. Hilioti, S. Lind-Iversen, and K. Brown. 1997. "Effect of Pollination on Accumulation of ACC Synthase and ACC Oxidase Transcripts, Ethylene Production and Flower Petal Abscission in Geranium (*Pelargonium x Hortorum* L.H. Bailey)." *Plant Molecular Biology* 34(6):855–65.
- Czechowski, Tomasz, Rajendra P. Bari, Mark Stitt, Wolf-Rüdiger Scheible, and Michael K. Udvardi. 2004. "Real-Time RT-PCR Profiling of over 1400 Arabidopsis Transcription Factors: Unprecedented Sensitivity Reveals Novel Root- and Shoot-Specific Genes." *The Plant Journal* 38(2):366–79.
- DeWitt, Thomas J., Andrew Sih, and David Sloan Wilson. 1998. "Costs and Limits of Phenotypic Plasticity." *Trends in Ecology & Evolution* 13(2):77–81.
- Diaz-Mendoza, Mercedes, Blanca Velasco-Arroyo, M. Estrella Santamaria, Pablo González-Melendi, Manuel Martinez, and Isabel Diaz. 2016. "Plant Senescence and Proteolysis: Two Processes with One Destiny." *Genetics and Molecular Biology* 39(3):329–38.
- Doll, Jasmin, Maren Muth, Lena Riester, Sabrina Nebel, Justine Bresson, Hsin-Chieh Lee, and Ulrike Zentgraf. 2020. "Arabidopsis Thaliana WRKY25 Transcription Factor Mediates Oxidative Stress Tolerance and Regulates Senescence in a Redox-Dependent Manner." *Frontiers in Plant Science* 10:1734.

- Van Doorn, Wouter G. and Ernst J. Woltering. 2008. "Physiology and Molecular Biology of Petal Senescence." *Journal of Experimental Botany* 59(3):453–80.
- E. Dimitriadou, K. Hornik, F. Leisch, D. Meyer, A. Weingessel, E1071: 2006. "Misc Functions of the Department of Statistics (E1071)."
- Earley, Keith W., Jeremy R. Haag, Olga Pontes, Kristen Opper, Tom Juehne, Keming Song, and Craig S. Pikaard. 2006. "Gateway-Compatible Vectors for Plant Functional Genomics and Proteomics." *Plant Journal* 45(4):616–29.
- Eulgem, Thomas, Paul J. Rushton, Silke Robatzek, and Imre E. Somssich. 2000. "The WRKY Superfamily of Plant Transcription Factors." *Trends in Plant Science* 5(5):199–206.
- Fan, Kai, Noreen Bibi, Susheng Gan, Feng Li, Shuna Yuan, Mi Ni, Ming Wang, Hao Shen, and Xuede Wang. 2015. "A Novel NAP Member GhNAP Is Involved in Leaf Senescence in *Gossypium hirsutum*." *Journal of Experimental Botany* 66(15):4669–82.
- Fan, Kai, Hao Shen, Noreen Bibi, Feng Li, Shuna Yuan, Ming Wang, and Xuede Wang. 2015. "Molecular Evolution and Species-Specific Expansion of the NAP Members in Plants." *Journal of Integrative Plant Biology* 57(8):673–87.
- Fei, Zhangjun, Je-Gun Joung, Xuemei Tang, Yi Zheng, Mingyun Huang, Je Min Lee, Ryan McQuinn, Denise M. Tieman, Rob Alba, Harry J. Klee, and James J. Giovannoni. 2011. "Tomato Functional Genomics Database: A Comprehensive Resource and Analysis Package for Tomato Functional Genomics." *Nucleic Acids Research* 39(Database issue):D1156-63.
- Feller, Urs, Iwona Anders, and Tadahiko Mae. 2008. "Rubiscolytics: Fate of Rubisco after Its Enzymatic Function in a Cell Is Terminated." Pp. 1615–24 in *Journal of Experimental Botany*. Vol. 59.
- Fernandez, Paula, Sebastin Moschen, Norma Paniago, and Ruth A. 2012. "Functional Approaches to Study Leaf Senescence in Sunflower." in *Senescence*. InTech.
- Ferrante, A., P. Vernieri, F. Tognoni, and G. Serra. 2006. "Changes in Abscisic Acid and Flower Pigments during Floral Senescence of *Petunia*." *Biologia Plantarum* 50(4):581–85.
- Gan, Susheng and Richard M. Amasino. 1995. "Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin." *Science* 270:1986–88.
- Gao, Shan, Jiong Gao, Xiaoyu Zhu, Yi Song, Zhongpeng Li, Guodong Ren, Xin Zhou, and Benke Kuai. 2016. "ABF2, ABF3, and ABF4 Promote ABA-Mediated Chlorophyll Degradation and Leaf Senescence by Transcriptional Activation of Chlorophyll Catabolic Genes and Senescence-Associated Genes in *Arabidopsis*." *Molecular Plant* 9(9):1272–85.
- Garapati, Prashanth, Gang-Ping Xue, Sergi Munné-Bosch, and Salma Balazadeh. 2015. "Transcription Factor ATAF1 in *Arabidopsis* Promotes Senescence by Direct Regulation of Key Chloroplast Maintenance and Senescence Transcriptional Cascades." *Plant Physiology* 168(3):1122–39.
- Gepstein, Shimon, Gazalah Sabehi, Marie-Jeanne Carp, Taleb Hajouj, Mizied Falah Orna Neshet, Inbal Yariv, Chen Dor, and Michal Bassani. 2003. "Large-Scale Identification of Leaf Senescence-Associated Genes." *The Plant Journal* 36(5):629–42.
- Gerats, Tom and Michiel Vandenbussche. 2005. "A Model System for Comparative Research: *Petunia*." *Trends in Plant Science* 10(5):251–56.
- Ghanem, Michel Edmond, Alfonso Albacete, Cristina Martínez-Andújar, Manuel Acosta, Remedios Romero-Aranda, Ian C. Dodd, Stanley Lutts, and Francisco Pérez-Alfocea. 2008. "Hormonal Changes during Salinity-Induced Leaf Senescence in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.)." *Journal of Experimental Botany* 59(11):3039–50.
- Gombert, Julie, Philippe Etienne, Alain Ourry, and Frédéric Le Dily. 2006. "The Expression Patterns of SAG12/Cab Genes Reveal the Spatial and Temporal Progression of Leaf Senescence in *Brassica napus* L. with Sensitivity to the Environment." *Journal of Experimental Botany* 57(9):1949–56.
- Gonzalez, Sergio, Bernardo Clavijo, Máximo Rivarola, Patricio Moreno, Paula Fernandez, Joaquín Dopazo, and Norma Paniago. 2017. "ATGC Transcriptomics: A Web-Based Application to Integrate, Explore and Analyze de Novo Transcriptomic Data." *BMC Bioinformatics* 18(1):121.
- Graham, Laura E., Jos H. M. Schippers, Paul P. Dijkwel, and Carol Wagstaff. 2012. "Ethylene and

- Senescence Processes." Pp. 305–41 in *Annual Plant Reviews Volume 44*. Vol. 44. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Grbic, Vojislava. 2002. "Spatial Expression Pattern of SAG12:GUS Transgene in Tobacco (*Nicotiana Tabacum*)." *Physiologia Plantarum* 116(3):416–22.
- Grbic, Vojislava and Anthony B. Bleeker. 1995. "Ethylene Regulates the Timing of Leaf Senescence in *Arabidopsis*." *The Plant Journal* 8(4):595–602.
- Gregersen, Per L., Andrea Culetic, Luca Boschian, and Karin Krupinska. 2013. "Plant Senescence and Crop Productivity." *Plant Molecular Biology* 82(6):603–22.
- Gregersen, Per L. and Preben Bach Holm. 2007. "Transcriptome Analysis of Senescence in the Flag Leaf of Wheat (*Triticum Aestivum* L.)." *Plant Biotechnology Journal* 5(1):192–206.
- Gu, Lijiao, Lingling Dou, Yaning Guo, Hantao Wang, Libei Li, Congcong Wang, Liang Ma, Hengling Wei, and Shuxun Yu. 2019. "The WRKY Transcription Factor GhWRKY27 Coordinates the Senescence Regulatory Pathway in Upland Cotton (*Gossypium Hirsutum* L.)." *BMC Plant Biology* 19(1):116.
- Gu, Lijiao, Hengling Wei, Hantao Wang, Junji Su, and Shuxun Yu. 2018. "Characterization and Functional Analysis of GhWRKY42, a Group IId WRKY Gene, in Upland Cotton (*Gossypium Hirsutum* L.)." *BMC Genetics* 19(1):48.
- Guamet, Juan J., Jorge G. Willemoes, and Edgardo R. Montaldi. 1989. "Modulation of Progressive Leaf Senescence by the Red:Far-Red Ratio of Incident Light." *Botanical Gazette* 150(2):148–51.
- Guiboileau, Anne, Rodnay Sormani, Christian Meyer, and Céline Masclaux-Daubresse. 2010. "Senescence and Death of Plant Organs: Nutrient Recycling and Developmental Regulation." *Comptes Rendus Biologies* 333(4):382–91.
- Guindon, Stéphane, Jean Francois Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, and Olivier Gascuel. 2010. "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." *Systematic Biology* 59(3):307–21.
- Guo, Y.; Gan, S., Yongfeng Guo, Susheng Gan, S. Guo, Y.; Gan, Yongfeng Guo, and Susheng Gan. 2005. "Leaf Senescence: Signals, Execution, and Regulation." *Curr Top Dev Biol* (71):83–112.
- Guo, Pengru, Zhonghai Li, Peixin Huang, Bosheng Li, Shuang Fang, Jinfang Chu, and Hongwei Guo. 2017. "A Tripartite Amplification Loop Involving the Transcription Factor WRKY75, Salicylic Acid, and Reactive Oxygen Species Accelerates Leaf Senescence." *Plant Cell* 29(11):2854–70.
- Guo, Y. and S. S. Gan. 2014. "Translational Researches on Leaf Senescence for Enhancing Plant Productivity and Quality." *Journal of Experimental Botany* 65(14):3901–13.
- Guo, Yongfeng and Susheng Gan. 2006. "AtNAP, a NAC Family Transcription Factor, Has an Important Role in Leaf Senescence." *Plant Journal* 46(4):601–12.
- Hall, T. A. 1999. "Hall, T.A." *BioEdit A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT*. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.
- Han, Muho, Chi Yeol Kim, Junok Lee, Sang Kyu Lee, and Jong Seong Jeon. 2014. "OsWRKY42 Represses OsMT1d and Induces Reactive Oxygen Species and Leaf Senescence in Rice." *Molecules and Cells* 37(7):532–39.
- Harris, Michael J. and William H. Outlaw. 1991. "Rapid Adjustment of Guard-Cell Abscisic Acid Levels to Current Leaf-Water Status." *Plant Physiology* 95(1):171–73.
- He, Ping, Mitsuru Osaki, Masako Takebe, Takuro Shinano, and Jun Wasaki. 2005. "Endogenous Hormones and Expression of Senescence-Related Genes in Different Senescent Types of Maize." *Journal of Experimental Botany* 56(414):1117–28.
- He, Yuehui, Hirotada Fukushige, David F. Hildebrand, and Susheng Gan. 2002. "Evidence Supporting a Role of Jasmonic Acid in *Arabidopsis* Leaf Senescence." *Plant Physiology* 128(3):876–84.
- Hénanff, Gaëlle Le, Camille Profizi, Barbara Courteaux, Fanja Rabenoelina, and Clémentine Gérard. 2013. "Grapevine NAC1 Transcription Factor as a Convergent Node in Developmental Processes, Abiotic Stresses, and Necrotrophic / Biotrophic Pathogen Tolerance." *Plant Physiology* 64(16):4877–93.

- Hensel, L. L., V. Grbić, D. A. Baumgarten, and A. B. Bleeker. 1993. "Developmental and Age-Related Processes That Influence the Longevity and Senescence of Photosynthetic Tissues in Arabidopsis." *The Plant Cell* 5(5):553–64.
- Hickman, Richard, Claire Hill, Christopher A. Penfold, Emily Breeze, Laura Bowden, Jonathan D. Moore, Peijun Zhang, Alison Jackson, Emma Cooke, Findlay Bewicke-Copley, Andrew Mead, Jim Beynon, David L. Wild, Katherine J. Denby, Sascha Ott, and Vicky Buchanan-Wollaston. 2013. "A Local Regulatory Network around Three NAC Transcription Factors in Stress Responses and Senescence in Arabidopsis Leaves." *Plant Journal* 75(1):26–39.
- Himelblau, Edward and Richard M. Amasino. 2001. "Nutrients Mobilized from Leaves of Arabidopsis Thaliana during Leaf Senescence." *Journal of Plant Physiology* 158(10):1317–23.
- HORSCH, R. B., J. E. FRY, N. L. HOFFMANN, D. EICHHOLTZ, S. G. ROGERS, and R. T. FRALEY. 1985. "A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants." *Science* 227(4691):1229–31.
- Hörtensteiner, Stefan. 2009. "Stay-Green Regulates Chlorophyll and Chlorophyll-Binding Protein Degradation during Senescence." *Trends in Plant Science* 14(3):155–62.
- Hörtensteiner, Stefan and Urs Feller. 2002. "Nitrogen Metabolism and Remobilization during Senescence." *Journal of Experimental Botany* 53(370):927–37.
- Hörtensteiner, Stefan and Bernhard Kräutler. 2011. "Chlorophyll Breakdown in Higher Plants." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1807(8):977–88.
- Hu, Honghong, Mingqiu Dai, Jialing Yao, Benze Xiao, Xianghua Li, Qifa Zhang, and Lizhong Xiong. 2006. "Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) Transcription Factor Enhances Drought Resistance and Salt Tolerance in Rice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(35):12987–92.
- Hu, Ruibo, Guang Qi, Yingzhen Kong, Dejing Kong, Qian Gao, and Gongke Zhou. 2010. "Comprehensive Analysis of NAC Domain Transcription Factor Gene Family in Populus Trichocarpa." *BMC Plant Biology* 10(1):145.
- Hu, Yanru, Yanjuan Jiang, Xiao Han, Houping Wang, Jinjing Pan, and Diqiu Yu. 2017. *Jasmonate Regulates Leaf Senescence and Tolerance to Cold Stress: Crosstalk with Other Phytohormones*. Vol. 68. Oxford University Press.
- Huang, Shengxiong, Yongfeng Gao, Jikai Liu, Xiaoli Peng, Xiangli Niu, Zhangjun Fei, Shuqing Cao, and Yongsheng Liu. 2012. "Genome-Wide Analysis of WRKY Transcription Factors in Solanum Lycopersicum." *Molecular Genetics and Genomics* 287(6):495–513.
- Inada, N., A. Sakai, H. Kuroiwa, and T. Kuroiwa. 1999. "Senescence Program in Rice (Oryza Sativa L.) Leaves: Analysis of the Blade of the Second Leaf at the Tissue and Cellular Levels." *Protoplasma* 207(3–4):222–32.
- Janack, Bianka, Paula Sosoi, Karin Krupinska, and Klaus Humbeck. 2016. "Knockdown of WHIRLY1 Affects Drought Stress-Induced Leaf Senescence and Histone Modifications of the Senescence-Associated Gene HvS40." *Plants* 5(3):1–3.
- Jespersen, David, Jingjin Yu, and Bingru Huang. 2015. "Metabolite Responses to Exogenous Application of Nitrogen, Cytokinin, and Ethylene Inhibitors in Relation to Heat-Induced Senescence in Creeping Bentgrass" edited by Z. Chan. *PLOS ONE* 10(3):e0123744.
- Jespersen, David, Jing Zhang, and Bingru Huang. 2016. "Chlorophyll Loss Associated with Heat-Induced Senescence in Bentgrass." *Plant Science* 249:1–12.
- Jiang, Yanjuan, Gang Liang, Shizhuo Yang, and Diqiu Yu. 2014. "Arabidopsis WRKY57 Functions as a Node of Convergence for Jasmonic Acid- and Auxin-Mediated Signaling in Jasmonic Acid-Induced Leaf Senescence." *Plant Cell* 26(1):230–45.
- Jibrán, Rubina, Donald A Hunter, Paul P Dijkwel, Donald A. Hunter, and Paul P. Dijkwel. 2013. "Hormonal Regulation of Leaf Senescence through Integration of Developmental and Stress Signals." *Plant Molecular Biology* 82(6):547–61.
- Jin, Hee Kim, Ryun Woo Hye, Jeongsik Kim, Ok Lim Pyung, Chul Lee In, Hee Choi Seung, Daehee Hwang, Gil Nam Hong, Hee Jin Kim, Ryun Woo Hye, Jeongsik Kim, Ok Lim Pyung, Chul Lee In, Hee Choi Seung, Daehee Hwang, and Gil Nam Hong. 2009. "Trifurcate Feed-Forward Regulation of Age-

- Dependent Cell Death Involving MiR164 in Arabidopsis." *Science* 323(5917):1053–57.
- Jin, Jinpu, Feng Tian, De-Chang Yang, Yu-Qi Meng, Lei Kong, Jingchu Luo, and Ge Gao. 2017. "PlantTFDB 4.0: Toward a Central Hub for Transcription Factors and Regulatory Interactions in Plants." *Nucleic Acids Research* 45(D1):D1040–45.
- Jin, Xiaoli, Jing Ren, Eviatar Nevo, Xuegui Yin, Dongfa Sun, and Junhua Peng. 2017. "Divergent Evolutionary Patterns of NAC Transcription Factors Are Associated with Diversification and Gene Duplications in Angiosperm." *Frontiers in Plant Science* 8:1156.
- Jing, Hai-Chun, Marcel J. G. Sturre, Jacques Hille, and Paul P. Dijkwel. 2002. "Arabidopsis Onset of Leaf Death Mutants Identify a Regulatory Pathway Controlling Leaf Senescence." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 32(1):51–63.
- Jing, Hai Chun, Jos H. M. Schippers, Jacques Hille, and Paul P. Dijkwel. 2005. "Ethylene-Induced Leaf Senescence Depends on Age-Related Changes and OLD Genes in Arabidopsis." *Journal of Experimental Botany* 56(421):2915–23.
- Jing, Shaojuan, Xiang Zhou, Yu Song, and Diqiu Yu. 2009. "Heterologous Expression of OsWRKY23 Gene Enhances Pathogen Defense and Dark-Induced Leaf Senescence in Arabidopsis." *Plant Growth Regulation* 58(2):181–90.
- John, C. F., K. Morris, B. R. Jordan, B. Thomas, and S. A-H-Mackerness. 2001. "Ultraviolet-B Exposure Leads to Up-regulation of Senescence-associated Genes in Arabidopsis Thaliana." *Journal of Experimental Botany* 52(359):1367–73.
- Jones, Michelle L. 2013. "Mineral Nutrient Remobilization during Corolla Senescence in Ethylene-Sensitive and -Insensitive Flowers." *AoB PLANTS* 5:1–11.
- Jones, Michelle L., Gunching S. Chaffin, Jocelyn R. Eason, and David G. Clark. 2005. "Ethylene-Sensitivity Regulates Proteolytic Activity and Cysteine Protease Gene Expression in Petunia Corollas." *Journal of Experimental Botany* 56(420):2733–44.
- Jung, Choonkyun, Seoung Hyun Lyou, Songyion Yeu, Myeong Ae Kim, Sangkee Rhee, Minkyun Kim, Jong Seob Lee, Yang Do Choi, and Jong Joo Cheong. 2007. "Microarray-Based Screening of Jasmonate-Responsive Genes in Arabidopsis Thaliana." *Plant Cell Reports* 26(7):1053–63.
- Kato, Yusuke, Shinya Murakami, Yumiko Yamamoto, Hiroshi Chatani, Yoshihiko Kondo, Takeshi Nakano, Akiho Yokota, and Fumihiko Sato. 2004. "The DNA-Binding Protease, CND41, and the Degradation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in Senescent Leaves of Tobacco." *Planta* 220(1):97–104.
- Kaup, Marianne T., Carol D. Froese, and John E. Thompson. 2002. "A Role for Diacylglycerol Acyltransferase during Leaf Senescence." *Plant Physiology* 129(4):1616–26.
- Kawaura, Kanako, Keiichi Mochida, and Yasunari Ogihara. 2008. "Genome-Wide Analysis for Identification of Salt-Responsive Genes in Common Wheat." *Functional and Integrative Genomics* 8(3):277–86.
- Kim, H. J., H. Ryu, S. H. Hong, H. R. Woo, P. O. Lim, I. C. Lee, J. Sheen, H. G. Nam, and I. Hwang. 2006. "Cytokinin-Mediated Control of Leaf Longevity by AHK3 through Phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(3):814–19.
- Kim, Hyo Jung, Sung Hyun Hong, You Wang Kim, Il Hwan Lee, Ji Hyung Jun, Bong Kwan Phee, Timilsina Rupak, Hana Jeong, Yeonmi Lee, Byoung Seok Hong, Hong Gil Nam, Hye Ryun Woo, and Pyung Ok Lim. 2014. "Gene Regulatory Cascade of Senescence-Associated NAC Transcription Factors Activated by ETHYLENE-INSENSITIVE2-Mediated Leaf Senescence Signalling in Arabidopsis." *Journal of Experimental Botany* 65(14):4023–36.
- Kim, Hyo Jung, Hong Gil Nam, and Pyung Ok Lim. 2016. "Regulatory Network of NAC Transcription Factors in Leaf Senescence." *Current Opinion in Plant Biology* 33:48–56.
- Kim, Jeong Im, Angus S. Murphy, Dongwon Baek, Shin Woo Lee, Dae Jin Yun, Ray A. Bressan, and Meena L. Narasimhan. 2011. "YUCCA6 Over-Expression Demonstrates Auxin Function in Delaying Leaf Senescence in Arabidopsis Thaliana." *Journal of Experimental Botany* 62(11):3981–92.
- Kim, Jeongsik, Hye Ryun Woo, and Hong Gil Nam. 2016. "Toward Systems Understanding of Leaf Senescence: An Integrated Multi-Omics Perspective on Leaf Senescence Research." *Molecular Plant*



9(6):813–25.

- Kim, Joonyup, Caren Chang, and Mark L. Tucker. 2015. "To Grow Old: Regulatory Role of Ethylene and Jasmonic Acid in Senescence." *Frontiers in Plant Science* 6(January):1–7.
- Kim, Ye Sol, Yasuhito Sakuraba, Su Hyun Han, Soo Cheul Yoo, and Nam Chon Paek. 2013. "Mutation of the Arabidopsis NAC016 Transcription Factor Delays Leaf Senescence." *Plant and Cell Physiology* 54(10):1660–72.
- Van Kleunen, Mark and Markus Fischer. 2005. "Constraints on the Evolution of Adaptive Phenotypic Plasticity in Plants." *New Phytologist* 166(1):49–60.
- Kozomara, Ana, Maria Birgaoanu, and Sam Griffiths-Jones. 2019. "MiRBase: From MicroRNA Sequences to Function." *Nucleic Acids Research* 47(D1):D155–62.
- Kusaba, Makoto, Ayumi Tanaka, and Ryouichi Tanaka. 2013. "Stay-Green Plants: What Do They Tell Us about the Molecular Mechanism of Leaf Senescence." *Photosynthesis Research* 117(1–3):221–34.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227(5259):680–85.
- Lambert, Rocío, Francisco Antonio Quiles, Gregorio Gálvez-Valdivieso, and Pedro Piedras. 2017. "Nucleases Activities during French Bean Leaf Aging and Dark-Induced Senescence." *Journal of Plant Physiology* 218:235–42.
- Langston, Brennick J., Shuangyi Bai, and Michelle L. Jones. 2005. "Increases in DNA Fragmentation and Induction of a Senescence-Specific Nuclease Are Delayed during Corolla Senescence in Ethylene-Insensitive (Etr1-1) Transgenic Petunias." *Journal of Experimental Botany* 56(409):15–23.
- Lartey, Robert, Soumitra Ghoshroy, Joe Ho, and Vitaly Citovsky. 1997. "Movement and Subcellular Localization of a Tobamovirus in *Arabidopsis*." *The Plant Journal* 12(3):537–45.
- Le, Dung Tien, Rie Nishiyama, Yasuko Watanabe, Keiichi Mochida, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Kazuo Shinozaki, and Lam-Son Phan Tran. 2011. "Genome-Wide Survey and Expression Analysis of the Plant-Specific NAC Transcription Factor Family in Soybean during Development and Dehydration Stress." *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* 18(4):263–76.
- Lee, In Chul, Suk Whan Hong, Sung Soo Whang, Pyung Ok Lim, Hong Gil Nam, and Ja Choon Koo. 2011. "Age-Dependent Action of an ABA-Inducible Receptor Kinase, RPK1, as a Positive Regulator of Senescence in Arabidopsis Leaves." *Plant and Cell Physiology* 52(4):651–62.
- Lee, Ruey Hua, Chung Hua Wang, Lin Tzu Huang, and Shu Grace Chen. 2001. "Leaf Senescence in Rice Plants: Cloning and Characterization of Senescence up-Regulated Genes." *Journal of Experimental Botany* 52(358):1117–21.
- Lee, Sangmin, Hyo Jun Lee, Sung Un Huh, Kyung Hee Paek, Jun Ho Ha, and Chung Mo Park. 2014. "The Arabidopsis NAC Transcription Factor NTL4 Participates in a Positive Feedback Loop That Induces Programmed Cell Death under Heat Stress Conditions." *Plant Science* 227:76–83.
- Lee, Sangmin, Pil Joon Seo, Hyo Jun Lee, and Chung Mo Park. 2012. "A NAC Transcription Factor NTL4 Promotes Reactive Oxygen Species Production during Drought-Induced Leaf Senescence in Arabidopsis." *Plant Journal* 70(5):831–44.
- Lei, Wei, Yan Li, Xiuhong Yao, Kang Qiao, Lin Wei, Baohui Liu, Dawei Zhang, and Honghui Lin. 2020. "NAP Is Involved in GA-Mediated Chlorophyll Degradation and Leaf Senescence by Interacting with DELLAs in Arabidopsis." *Plant Cell Reports* 39(1):75–87.
- Li, Meng-Yao Yao, Zhi-Sheng Sheng Xu, Chang Tian, Ying Huang, Feng Wang, and Ai-Sheng Sheng Xiong. 2016. "Genomic Identification of WRKY Transcription Factors in Carrot (*Daucus Carota*) and Analysis of Evolution and Homologous Groups for Plants." *Scientific Reports* 6(March):1–17.
- Li, Wei and Yongfeng Guo. 2014. "Transcriptome, Transcription Factors and Transcriptional Regulation of Leaf Senescence." *J Bioinfo Comp Genom* (1):1–3.
- Li, Wei, Xiaoxu Li, Jiangtao Chao, Zenglin Zhang, Weifeng Wang, and Yongfeng Guo. 2018. "NAC Family Transcription Factors in Tobacco and Their Potential Role in Regulating Leaf Senescence." *Frontiers in Plant Science* 871(December):1–15.

- Li, Zhonghai, Jinying Peng, Xing Wen, and Hongwei Guo. 2012. "Gene Network Analysis and Functional Studies of Senescence-Associated Genes Reveal Novel Regulators of Arabidopsis Leaf SenescenceF." *Journal of Integrative Plant Biology* 54(8):526–39.
- Li, Zhonghai, Jinying Peng, Xing Wen, and Hongwei Guo. 2013. "ETHYLENE-INSENSITIVE3 Is a Senescence-Associated Gene That Accelerates Age-Dependent Leaf Senescence by Directly Repressing MiR164 Transcription in Arabidopsis." *The Plant Cell* 25(9):3311–28.
- Liang, Chengzhen, Yiqin Wang, Yana Zhu, Jiuyou Tang, Bin Hu, Linchuan Liu, Shujun Ou, Hongkai Wu, Xiaohong Sun, Jinfang Chu, and Chengcai Chu. 2014. "OsNAP Connects Abscisic Acid and Leaf Senescence by Fine-Tuning Abscisic Acid Biosynthesis and Directly Targeting Senescence-Associated Genes in Rice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(27):10013–18.
- Lim, Pyung Ok, Hyo Jung Kim, and Hong Gil Nam. 2007. "Leaf Senescence." *Annual Review of Plant Biology* 58(1):115–36.
- Lim, Pyung Ok, In Chul Lee, Junyoung Kim, Hyo Jung Kim, Jong Sang Ryu, Hye Ryun Woo, and Hong Gil Nam. 2010. "Auxin Response Factor 2 (ARF2) Plays a Major Role in Regulating Auxin-Mediated Leaf Longevity." *Journal of Experimental Botany* 61(5):1419–30.
- Lim, Pyung Ok, Hye Ryun Woo, and Hong Gil Nam. 2003. "Molecular Genetics of Leaf Senescence in Arabidopsis." *Trends in Plant Science* 8(6):272–78.
- Lin, Min, Chaoyou Pang, Shuli Fan, Meizhen Song, Hengling Wei, and Shuxun Yu. 2015. "Global Analysis of the *Gossypium Hirsutum* L. Transcriptome during Leaf Senescence by RNA-Seq." *BMC Plant Biology* 15(1):43.
- Lindemose, Soren, Michael K. Jensen, Jan Van De Velde, Charlotte O'Shea, Ken S. Heyndrickx, Christopher T. Workman, Klaas Vandepoele, Karen Skriver, and Federico De Masi. 2014. "A DNA-Binding-Site Landscape and Regulatory Network Analysis for NAC Transcription Factors in Arabidopsis Thaliana." *Nucleic Acids Research* 42(12):7681–93.
- Lira, Bruno S., Giovanna Gramegna, Bruna A. Trench, Frederico R. R. Alves, Eder M. Silva, Geraldo F. F. Silva, Venkatesh P. Thirumalaikumar, Alessandra C. D. Lupi, Diego Demarco, Eduardo Purgatto, Fabio T. S. Nogueira, Salma Balazadeh, Luciano Freschi, and Magdalena Rossi. 2017. "Manipulation of a Senescence-Associated Gene Improves Fleshy Fruit Yield." *Plant Physiology* 175(1):77–91.
- Liu, Hui, Yuhong Zhou, Hanxia Li, Taotao Wang, Junhong Zhang, Bo Ouyang, and Zhibiao Ye. 2018. "Molecular and Functional Characterization of ShNAC1, an NAC Transcription Factor from *Solanum Habrochaites*." *Plant Science* 271(March):9–19.
- Liu, Li, Wei Xu, Xuesong Hu, Haoju Liu, and Yongjun Lin. 2016. "W-Box and G-Box Elements Play Important Roles in Early Senescence of Rice Flag Leaf." *Scientific Reports* 6(September 2015):1–9.
- Liu, Wei, Wenwei Zhang, Na Zheng, Weibo Zhai, and Fangjun Qi. 2018. "Study of Cotton Leaf Senescence Induced by *Alternaria Alternata* Infection." Pp. 161–71 in *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1744. Humana Press Inc.
- Liu, Xiaochuan, Zhonghai Li, Zhiqiang Jiang, Yi Zhao, Jinying Peng, Jinpu Jin, Hongwei Guo, and Jingchu Luo. 2011. "LSD: A Leaf Senescence Database." *Nucleic Acids Research* 39(SUPPL. 1):D1103-7.
- Liu, Yong Zhong, M. N. R. Baig, Rui Fan, Jun Li Ye, Yin Chuan Cao, and Xiu Xin Deng. 2009. "Identification and Expression Pattern of a Novel NAM, ATAF, and CUC-like Gene from *Citrus Sinensis* Osbeck." *Plant Molecular Biology Reporter* 27(3):292–97.
- Lohman, Karin N., Susheng Gan, Manorama C. John, and Richard M. Amasino. 1994. "Molecular Analysis of Natural Leaf Senescence in Arabidopsis Thaliana." *Physiologia Plantarum* 92(2):322–28.
- Lorenza Costa, María, Dana Martinez, Facundo Gomez, Juan Guiamet, Maria L. Costa, Dana E. Martínez, Facundo M. Gomez, Cristian A. Carrión, and Juan J. Guiamet. 2013. "Plastid Development in Leaves During Growth and Senescence, Advances in Photosynthesis and Respiration 36." *Springer* 417–33.
- Løvdal, Trond and Cathrine Lillo. 2009. "Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time PCR Normalization in Tomato Subjected to Nitrogen, Cold, and Light Stress." *Analytical Biochemistry* 387(2):238–42.
- Luoni, S. B., F. H. Astigueta, S. Nicosia, S. Moschen, P. Fernandez, and R. Heinz. 2019. "Transcription Factors Associated with Leaf Senescence in Crops." *Plants* 8(10).

- Ma, Xuemin, Youjun Zhang, Veronika Turečková, Gang Ping Xue, Alisdair R. Fernie, Bernd Mueller-Roeber, and Salma Balazadeh. 2018. "The NAC Transcription Factor SLNAP2 Regulates Leaf Senescence and Fruit Yield in Tomato." *Plant Physiology* 177(3):1286–1302.
- Markham, Nicholas R. and Michael Zuker. 2008. "UNAFold: Software for Nucleic Acid Folding and Hybridization." *Methods in Molecular Biology* 453:3–31.
- Martinez, D. E., C. G. Bartoli, V. Grbic, and J. J. Guamet. 2007. "Vacuolar Cysteine Proteases of Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Are Common to Leaf Senescence Induced by Different Factors." *Journal of Experimental Botany* 58(5):1099–1107.
- Martínez, Dana E., María L. Costa, Facundo M. Gomez, Marisa S. Otegui, and Juan J. Guamet. 2008. "Senescence-Associated Vacuoles' Are Involved in the Degradation of Chloroplast Proteins in Tobacco Leaves." *Plant Journal* 56(2):196–206.
- Matallana-Ramirez, Lilian P., Mamoona Rauf, Sarit Farage-Barhom, Hakan Dortay, Gang Ping Xue, Wolfgang Dröge-Laser, Amnon Lers, Salma Balazadeh, and Bernd Mueller-Roeber. 2013. "NAC Transcription Factor ORE1 and Senescence-Induced BIFUNCTIONAL NUCLEASE1 (BFN1) Constitute a Regulatory Cascade in Arabidopsis." *Molecular Plant* 6(5):1438–52.
- Mayta, Martín L., Anabella F. Lodeyro, Juan J. Guamet, Vanesa B. Tognetti, Michael Melzer, Mohammad R. Hajirezaei, and Néstor Carrillo. 2018. "Expression of a Plastid-Targeted Flavodoxin Decreases Chloroplast Reactive Oxygen Species Accumulation and Delays Senescence in Aging Tobacco Leaves." *Frontiers in Plant Science* 9:1039.
- Meng, Chaomin, Caiping Cai, Tianzhen Zhang, and Wangzhen Guo. 2009. "Characterization of Six Novel NAC Genes and Their Responses to Abiotic Stresses in *Gossypium Hirsutum* L." *Plant Science* 176(3):352–59.
- Miao, Y., T. Laun, P. Zimmermann, and U. Zentgraf. 2005. "Targets of the WRKY53 Transcription Factor and Its Role during Leaf Senescence in Arabidopsis." *Plant Molecular Biology* 55(6):853–67.
- Miller, Jennifer D., Richard N. Artica, and Eva J. Pell. 1999. "Senescence-Associated Gene Expression during Ozone-Induced Leaf Senescence in Arabidopsis." *Plant Physiology* 120(4):1015–24.
- Moran, Rami. 1982. "Formulae for Determination of Chlorophyllous Pigments Extracted with N,N - Dimethylformamide ." *Plant Physiology* 69(6):1376–81.
- Morris, Karl, Soheila A. H. -Mackerness, Tania Page, C. Fred John, Alex M. Murphy, John P. Carr, and Vicky Buchanan-Wollaston. 2000. "Salicylic Acid Has a Role in Regulating Gene Expression during Leaf Senescence." *The Plant Journal* 23(5):677–85.
- Moschen, Sebastian, Sofia Bengoa Luoni, Norma B. Paniego, H. Esteban Hopp, Guillermo A. A. Dosio, Paula Fernandez, and Ruth A. Heinz. 2014. "Identification of Candidate Genes Associated with Leaf Senescence in Cultivated Sunflower (*Helianthus Annuus* L.)" edited by C. Gibas. *PLoS ONE* 9(8):e104379.
- Moschen, Sebastián, Sofía Bengoa Luoni, Julio A. Di Rienzo, María del Pilar Caro, Takayuki Tohge, Mutsumi Watanabe, Julien Hollmann, Sergio González, Máximo Rivarola, Francisco García-García, Joaquin Dopazo, Horacio Esteban Hopp, Rainer Hoefgen, Alisdair R. Fernie, Norma Paniego, Paula Fernández, and Ruth A. Heinz. 2016. "Integrating Transcriptomic and Metabolomic Analysis to Understand Natural Leaf Senescence in Sunflower." *Plant Biotechnology Journal* 14(2):719–34.
- Moschen, Sebastián, Johanna Marino, Salvador Nicosia, Janet Higgins, Saleh Alseekh, Francisco Astigueta, Sofia Bengoa Luoni, Máximo Rivarola, A. R. Alisdair R. Fernie, Nicolas Blanchet, N. B. Nicolas B. Langlade, Norma Paniego, Paula Fernández, and Ruth A. R. A. Heinz. 2019. "Exploring Gene Networks in Two Sunflower Lines with Contrasting Leaf Senescence Phenotype Using a System Biology Approach." *BMC Plant Biology* 19(1):1–15.
- Muñoz, Paula and Sergi Munné-Bosch. 2018. "Photo-Oxidative Stress during Leaf, Flower and Fruit Development." *Plant Physiology* 176(2):1004–14.
- Navabpour, Saeid, Karl Morris, Rebecca Allen, Elizabeth Harrison, Soheila A-H-Mackerness, and Vicky Buchanan-Wollaston. 2003. "Expression of Senescence-Enhanced Genes in Response to Oxidative Stress." *Journal of Experimental Botany* 54(391):2285–92.
- Noh, Yoo Sun and Richard M. Amasino. 1999. "Identification of a Promoter Region Responsible for the

- Senescence-Specific Expression of SAG12." *Plant Molecular Biology* 41(2):181–94.
- Noodén, L. D., G. M. Kahanak, and Y. Okatan. 1979. "Prevention of Monocarpic Senescence in Soybeans with Auxin and Cytokinin: An Antidote for Self-Destruction." *Science* 206(4420):841–43.
- Noodén, L. D. and J. P. Penney. 2001. "Correlative Controls of Senescence and Plant Death in *Arabidopsis Thaliana* (Brassicaceae)." *Journal of Experimental Botany* 52(364):2151–59.
- Oda-Yamamizo, Chihiro, Nobutaka Mitsuda, Shingo Sakamoto, Daisuke Ogawa, Masaru Ohme-Takagi, and Akemi Ohmiya. 2016. "The NAC Transcription Factor ANAC046 Is a Positive Regulator of Chlorophyll Degradation and Senescence in *Arabidopsis* Leaves." *Scientific Reports* 6(March):1–12.
- Olsen, Addie Nina, Heidi A. Ernst, Leila Lo Leggio, and Karen Skriver. 2005. "NAC Transcription Factors: Structurally Distinct, Functionally Diverse." *Trends in Plant Science* 10(2):79–87.
- Ono, Yuki, Shinya Wada, Masanori Izumi, Amane Makino, and Hiroyuki Ishida. 2013. "Evidence for Contribution of Autophagy to Rubisco Degradation during Leaf Senescence in *Arabidopsis Thaliana*." *Plant, Cell and Environment* 36(6):1147–59.
- Ooka, Hisako, Hisako Ooka, Kouji Satoh, Kouji Satoh, Koji Doi, Koji Doi, Toshifumi Nagata, Toshifumi Nagata, Yasuhiro Otomo, Yasuhiro Otomo, Kazuo Murakami, Kazuo Murakami, Kenichi Matsubara, Kenichi Matsubara, Naoki Osato, Naoki Osato, Jun Kawai, Jun Kawai, Piero Carninci, Piero Carninci, Yoshihide Hayashizaki, Yoshihide Hayashizaki, Koji Suzuki, Koji Suzuki, Keiichi Kojima, Keiichi Kojima, Yoshinori Takahara, Yoshinori Takahara, Koji Yamamoto, Koji Yamamoto, Shoshi Kikuchi, and Shoshi Kikuchi. 2003. "Comprehensive Analysis of NAC Family Genes in *Oryza Sativa* and *Arabidopsis Thaliana*." *DNA Research* 247:239–47.
- Pageau, Karine, Michèle Reisdorf-Cren, Jean François Morot-Gaudry, and Céline Masclaux-Daubresse. 2006. "The Two Senescence-Related Markers, GS1 (Cytosolic Glutamine Synthetase) and GDH (Glutamate Dehydrogenase), Involved in Nitrogen Mobilization, Are Differentially Regulated during Pathogen Attack and by Stress Hormones and Reactive Oxygen Species in Nicot." *Journal of Experimental Botany* 57(3):547–57.
- Pan, Lin Jie and Ling Jiang. 2014. "Identification and Expression of the WRKY Transcription Factors of Carica Papaya in Response to Abiotic and Biotic Stresses." *Molecular Biology Reports* 41(3):1215–25.
- Park, Joon Hyun, Sung Aeong Oh, Young Hee Kim, Hye Ryun Woo, and Hong Gil Nam. 1998. "Differential Expression of Senescence-Associated MRNAs during Leaf Senescence Induced by Different Senescence-Inducing Factors in *Arabidopsis*." *Plant Molecular Biology*.
- Pereira-Santana, Alejandro, Luis David Alcaraz, Enrique Castaño, Lenin Sanchez-Calderon, Felipe Sanchez-Teyer, and Luis Rodriguez-Zapata. 2015. "Comparative Genomics of NAC Transcriptional Factors in Angiosperms: Implications for the Adaptation and Diversification of Flowering Plants" edited by J.-S. Zhang. *PLOS ONE* 10(11):e0141866.
- Perilli, Serena and Sabrina Sabatini. 2010. "Analysis of Root Meristem Size Development." Pp. 177–87 in.
- Pfaffl, M. W. 2001. "A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR." *Nucleic Acids Research* 29(9):45e – 45.
- Pfaffl, Michael W., Ales Tichopad, Christian Prgomet, and Tanja P. Neuvians. 2004. "Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and Sample Integrity: BestKeeper - Excel-Based Tool Using Pair-Wise Correlations." *Biotechnology Letters* 26(6):509–15.
- Phukan, Ujjal J., Gajendra S. Jeena, and Rakesh K. Shukla. 2016. "WRKY Transcription Factors: Molecular Regulation and Stress Responses in Plants." *Frontiers in Plant Science* 7(June):1–14.
- Pic, Emmanuelle, Bernard Teysseidier de la Serve, François Tardieu, and Olivier Turc. 2002. "Leaf Senescence Induced by Mild Water Deficit Follows the Same Sequence of Macroscopic, Biochemical, and Molecular Events as Monocarpic Senescence in Pea." *Plant Physiology* 128(1):236–46.
- Pimenta, Maiana Reis, Roberta Alves, Priscila Alves Silva, Giselle Camargo Mendes, Bernardes Brustolini, Durso Neves Caetano, Joao Paulo, Batista Machado, Otavio Jose, Cleydson Ferreira Silva, Gustavo Lea, Avelar Carpinetti, Bruno Paes Melo, Flores Silva Ferreira, Maximillir Dal-bianco, Edgard Augusto, De Toledo Picoli, Lima Aragao, Humberto Josue, Oliveira Ramos, Elizabeth Pacheco, Batista Fontes, and Francisco Jose. 2016. "The Stress-Induced Soybean NAC Transcription Factor GmNAC81 Plays a Positive Role in Developmentally Programmed Leaf Senescence." 57(March):1098–1114.

- Pinheiro, Guilherme L., Carolina S. Marques, Maximiller D. B. L. Costa, Pedro A. B. Reis, Murilo S. Alves, Claudine M. Carvalho, Luciano G. Fietto, and Elizabeth P. B. Fontes. 2009. "Complete Inventory of Soybean NAC Transcription Factors : Sequence Conservation and Expression Analysis Uncover Their Distinct Roles in Stress Response." *Gene* 444(1–2):10–23.
- Podzimska-Sroka, Dagmara, Charlotte O'Shea, Per Gregersen, and Karen Skriver. 2015. "NAC Transcription Factors in Senescence: From Molecular Structure to Function in Crops." *Plants* 4(3):412–48.
- Poret, Marine, Balakumaran Chandrasekar, Renier van der Hoorn, Laurent Coquet, Thierry Jouenne, and Jean-Christophe Avice. 2017. "Proteomic Investigations of Proteases Involved in Cotyledon Senescence: A Model to Explore the Genotypic Variability of Proteolysis Machinery Associated with Nitrogen Remobilization Efficiency during the Leaf Senescence of Oilseed Rape." *Proteomes* 5(4):29.
- Potschin, Maren, Silke Schlienger, Stefan Bieker, and Ulrike Zentgraf. 2014. "Senescence Networking: WRKY18 Is an Upstream Regulator, a Downstream Target Gene, and a Protein Interaction Partner of WRKY53." *Journal of Plant Growth Regulation* 33(1):106–18.
- Price, Anna Marie, D. F. Aros Orellana, Faezah Mohd Salleh, Ryan Stevens, Rosemary Acock, Vicky Buchanan-Wollaston, Anthony D. Stead, Hilary J. Rogers, Danilo F. Aro. Orellana, Faezah Mohd Salleh, Ryan Stevens, Rosemary Acock, Vicky Buchanan-Wollaston, Anthony D. Stead, and Hilary J. Rogers. 2008. "A Comparison of Leaf and Petal Senescence in Wallflower Reveals Common and Distinct Patterns of Gene Expression and Physiology." *Plant Physiology* 147(4):1898–1912.
- Pružinská, Adriana, Gaby Tanner, Sylvain Aubry, Iwona Anders, Simone Moser, Thomas Müller, Karl-Hans Ongania, Bernhard Kräutler, Ji-Young Youn, Sarah J. Liljegren, and Stefan Hörtensteiner. 2005. "Chlorophyll Breakdown in Senescent Arabidopsis Leaves. Characterization of Chlorophyll Catabolites and of Chlorophyll Catabolic Enzymes Involved in the Degreening Reaction." *Plant Physiology* 139(1):52–63.
- Qiu, Kai, Zhongpeng Li, Zhen Yang, Junyi Chen, Shouxin Wu, Xiaoyu Zhu, Shan Gao, Jiong Gao, Guodong Ren, Benke Kuai, and Xin Zhou. 2015. "EIN3 and ORE1 Accelerate Degreening during Ethylene-Mediated Leaf Senescence by Directly Activating Chlorophyll Catabolic Genes in Arabidopsis" edited by G. E. Schaller. *PLOS Genetics* 11(7):e1005399.
- Quirino, Betania F., Yoo Sun Noh, Edward Himelblau, and Richard M. Amasino. 2000. "Molecular Aspects of Leaf Senescence." *Trends in Plant Science* 5(7):278–82.
- Reid, Karen E., Niclas Olsson, James Schlosser, Fred Peng, and Steven T. Lund. 2006. "An Optimized Grapevine RNA Isolation Procedure and Statistical Determination of Reference Genes for Real-Time RT-PCR during Berry Development." *BMC Plant Biology* 6:27.
- Reid, Michael S. and Men-Jen Wu. 1992. "Ethylene and Flower Senescence." *Plant Growth Regulation* 11(1):37–43.
- Ren, Tingting, Jiawei Wang, Mingming Zhao, Xiaoming Gong, Shuxia Wang, Geng Wang, and Chunjiang Zhou. 2018. "Involvement of NAC Transcription Factor SiNAC1 in a Positive Feedback Loop via ABA Biosynthesis and Leaf Senescence in Foxtail Millet." *Planta* 247(1):53–68.
- Ricachenevsky, Felipe Klein, Raul Antonio Sperotto, Paloma Koprovski Menguer, and Janette Palma Fett. 2010. "Identification of Fe-Excess-Induced Genes in Rice Shoots Reveals a WRKY Transcription Factor Responsive to Fe, Drought and Senescence." *Molecular Biology Reports* 37(8):3735–45.
- Di Rienzo, J. A. 2009. "Statistical Software for the Analysis of Experiments of Functional Genomics."
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. W. 2018. "InfoStat Versión 2018." Retrieved February 15, 2020 (<http://www.infostat.com.ar>).
- Rivero, Rosa M., Jacinta Gimeno, Allen Van Deynze, Harkamal Walia, and Eduardo Blumwald. 2010. "Enhanced Cytokinin Synthesis in Tobacco Plants Expressing PSARK::IPT Prevents the Degradation of Photosynthetic Protein Complexes During Drought." *Plant and Cell Physiology* 51(11):1929–41.
- Robatzek, Silke and Imre E. Somssich. 2002. "Targets of AtWRKY6 Regulation during Plant Senescence and Pathogen Defense." *Genes and Development* 16(9):1139–49.
- Roberts, Irma N., Carla Caputo, María Victoria Criado, and Christiane Funk. 2012. "Senescence-Associated Proteases in Plants." *Physiologia Plantarum* 145(1):130–39.
- Rogers, Hilary J. 2012. "Is There an Important Role for Reactive Oxygen Species and Redox Regulation

- during Floral Senescence?" *Plant, Cell and Environment* 35(2):217–33.
- Rogers, Hilary J. 2013. "From Models to Ornamentals: How Is Flower Senescence Regulated?" *Plant Molecular Biology* 82(6):563–74.
- Rogers, Hilary and Sergi Munné-Bosch. 2016. "Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species and Redox Signaling during Leaf and Flower Senescence: Similar but Different." *Plant Physiology* 171(3):1560–68.
- Ruijter, J. M., C. Ramakers, W. M. H. Hoogaars, Y. Karlen, O. Bakker, M. J. B. van den Hoff, and A. F. M. Moorman. 2009. "Amplification Efficiency: Linking Baseline and Bias in the Analysis of Quantitative PCR Data." *Nucleic Acids Research* 37(6):e45–e45.
- Rushton, Paul J., Imre E. Somssich, Patricia Ringler, and Qingxi J. Shen. 2010. "WRKY Transcription Factors." *Trends in Plant Science* 15(5):247–58.
- Ryu, Stephen B. and Xuemin Wang. 1995. "Expression of Phospholipase D during Castor Bean Leaf Senescence." *Plant Physiology* 108(2):713–19.
- Sacher, Joseph A. 1957. "Relationship between Auxin and Membrane-Integrity in Tissue Senescence and Abscission." *Science* 125(3259):1199–1200.
- Sadras, V. 2000. "Effect of Verticillium Dahliae on Photosynthesis, Leaf Expansion and Senescence of Field-Grown Sunflower." *Annals of Botany* 86(5):1007–15.
- Sakuraba, Yasuhito, Ye-Sol Kim, Su-Hyun Han, Byoung-Doo Lee, and Nam-Chon Paek. 2015. "The Arabidopsis Transcription Factor NAC016 Promotes Drought Stress Responses by Repressing AREB1 Transcription through a Trifurcate Feed-Forward Regulatory Loop Involving NAP ." *The Plant Cell* 27(6):1771–87.
- Schippers, Jos H. M. 2015. "Transcriptional Networks in Leaf Senescence." *Current Opinion in Plant Biology* 27(Figure 1):77–83.
- Schippers, Jos H. M., Hai-Chun Jing, Jacques Hille, and Paul P. Dijkwel. 2007. "Developmental and Hormonal Control of Leaf Senescence." Pp. 145–70 in *Senescence Processes in Plants*. Vol. 26. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Schippers, Jos H. M., Adriano Nunes-Nesi, Roxana Apetrei, Jacques Hille, Alisdair R. Fernie, and Paul P. Dijkwel. 2008. "The Arabidopsis Onset of Leaf Death5 Mutation of Quinolinic Synthase Affects Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthesis and Causes Early Ageing." *Plant Cell* 20(10):2909–25.
- Schippers, Jos H. M., Romy Schmidt, Carol Wagstaff, and Hai-Chun Jing. 2015. "Living to Die and Dying to Live: The Survival Strategy behind Leaf Senescence." *Plant Physiology* 169(2):914–30.
- Schmülling, Thomas, Tomáš Werner, Michael Riefler, Eva Krupková, and Isabel Bartrina Y Manns. 2003. "Structure and Function of Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase Genes of Maize, Rice, Arabidopsis and Other Species." Pp. 241–52 in *Journal of Plant Research*. Vol. 116.
- Schwab, Rebecca, Stephan Ossowski, Markus Riefler, Norman Warthmann, and Detlef Weigel. 2006. "Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in Arabidopsis." *The Plant Cell* 18(5):1121–33.
- Seltmann, Martin A., Nadja E. Stingl, Jens K. Lautenschlaeger, Markus Krischke, Martin J. Mueller, and Susanne Berger. 2010. "Differential Impact of Lipoxygenase 2 and Jasmonates on Natural and Stress-Induced Senescence in Arabidopsis." *Plant Physiology* 152(4):1940–50.
- Seo, Pil Joon, Mi Jung Kim, Ju-Young Young Park, Sun-Young Young Kim, Jin Jeon, Yong-Hwan Hwan Lee, Jungmook Kim, and Chung-Mo Mo Park. 2010. "Cold Activation of a Plasma Membrane-Tethered NAC Transcription Factor Induces a Pathogen Resistance Response in Arabidopsis." *Plant Physiology* 152(4):661–71.
- Seo, Pil Joon and Chung Mo Park. 2011. "Signaling Linkage between Environmental Stress Resistance and Leaf Senescence in Arabidopsis." *Plant Signaling and Behavior* 6(10):1564–66.
- Shan, Qiwei, Yanpeng Wang, Jun Li, Yi Zhang, Kunling Chen, Zhen Liang, Kang Zhang, Jinxing Liu, Jianzhong Jeff Xi, Jin-Long Qiu, and Caixia Gao. 2013. "Targeted Genome Modification of Crop Plants Using a CRISPR-Cas System." *Nature Biotechnology* 31(8):686–88.
- Shan, Xiaoyi, Junxia Wang, Lingling Chua, Dean Jiang, Wen Peng, and Daoxin Xie. 2011. "The Role of

- Arabidopsis Rubisco Activase in Jasmonate-Induced Leaf Senescence." *Plant Physiology* 155(2):751–64.
- Shen, Hui, Yanbin Yin, Fang Chen, Ying Xu, and Richard A. Dixon. 2009. "A Bioinformatic Analysis of NAC Genes for Plant Cell Wall Development in Relation to Lignocellulosic Bioenergy Production." *Bioenergy Research* 2(4):217–32.
- Shibuya, Kenichi, Keiichi Shimizu, Tomoko Niki, and Kazuo Ichimura. 2014. "Identification of a NAC Transcription Factor, EPHEMERAL1, That Controls Petal Senescence in Japanese Morning Glory." *Plant Journal* 79(6):1044–51.
- Shinozaki, Yoshihito, Toshimitsu Tanaka, Isao Ogiwara, Motoki Kanekatsu, Wouter G. Van Doorn, and Tetsuya Yamada. 2014. "Expression of an AtNAP Gene Homolog in Senescing Morning Glory (*Ipomoea Nil*) Petals of Two Cultivars with a Different Flower Life Span." *Journal of Plant Physiology* 171(8):633–38.
- Singh, Anil Kumar, Vishal Sharma, Awadhesh Kumar Pal, Vishal Acharya, and Paramvir Singh Ahuja. 2013. "Genome-Wide Organization and Expression Profiling of the NAC Transcription Factor Family in Potato (*Solanum Tuberosum* L.)." *DNA Research* 20(4):403–23.
- Sklenky, Diane E. and Peter J. Davies. 2011. "Resource Partitioning to Male and Female Flowers of *Spinacia Oleracea* L. in Relation to Whole-Plant Monocarpic Senescence." *Journal of Experimental Botany* 62(12):4323–36.
- Soto-Burgos, Junmarie, Xiaohong Zhuang, Liwen Jiang, and Diane C. Bassham. 2018. "Dynamics of Autophagosome Formation." *Plant Physiology* 176(1):219–29.
- Sperotto, Raul A., Felipe K. Ricachenevsky, Guilherme L. Duarte, Tatiana Boff, Karina L. Lopes, Edilena R. Sperb, Michael A. Grusak, and Janette Palma Fett. 2009. "Identification of Up-Regulated Genes in Flag Leaves during Rice Grain Filling and Characterization of OsNAC5, a New ABA-Dependent Transcription Factor." *Planta* 230(5):985–1002.
- Su, Hongyan, Shizhong Zhang, Yanlei Yin, Dongzi Zhu, and Liya Han. 2015. "Genome-Wide Analysis of NAM-ATAF1,2-CUC2 Transcription Factor Family in *Solanum Lycopersicum*." *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 24(2):176–83.
- Tamary, Eyal, Reinat Nevo, Leah Naveh, Smadar Levin-Zaidman, Vladimir Kiss, Alon Savidor, Yishai Levin, Yoram Eyal, Ziv Reich, and Zach Adam. 2019. "Chlorophyll Catabolism Precedes Changes in Chloroplast Structure and Proteome during Leaf Senescence." *Plant Direct* 3(3):e00127.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods." *Molecular Biology and Evolution* 28(10):2731–39.
- Tan, Bao-Cai, Leina M. Joseph, Wen-Tao Deng, Lijuan Liu, Qin-Bao Li, Kenneth Cline, and Donald R. McCarty. 2003. "Molecular Characterization of the Arabidopsis 9-Cis Epoxycarotenoid Dioxygenase Gene Family." *The Plant Journal* 35(1):44–56.
- Taylor, C. B., P. A. Bariola, S. B. delCardayré, R. T. Raines, and P. J. Green. 1993. "RNS2: A Senescence-Associated RNase of Arabidopsis That Diverged from the S-RNases before Speciation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(11):5118–22.
- Thines, Bryan, Emily V. Parlan, and Elena C. Fulton. 2019. "Circadian Network Interactions with Jasmonate Signaling and Defense." *Plants* 8(8):252.
- Thomas, H. 2003. "Defining Senescence and Death." *Journal of Experimental Botany* 54(385):1127–32.
- Thomas, Howard, Catherine J. Howarth, Howard Thomas<sup>1</sup>, Catherine J. Howarth, Howard Thomas, and Catherine J. Howarth. 2000. "Five Ways to Stay Green." *Journal of Experimental Botany* 51(suppl\_1):329–37.
- Thompson, J., C. Taylor, and T. W. Wang. 2000. "Altered Membrane Lipase Expression Delays Leaf Senescence." Pp. 775–77 in *Biochemical Society Transactions*. Vol. 28. Portland Press Ltd.
- Thompson, John E., Carol D. Froese, Ewa Madey, Matthew D. Smith, and Yuwen Hong. 1998. "Lipid Metabolism during Plant Senescence." *Progress in Lipid Research* 37(2–3):119–41.
- Tripathi, Prateek, Roel C. Rabara, Tanner J. Langum, Ashley K. Boken, Deena L. Rushton, Darius D.

- Boomsma, Charles I. Rinerson, Jennifer Rabara, R. N. Reese, Xianfeng Chen, Jai S. Rohila, and Paul J. Rushton. 2012. "The WRKY Transcription Factor Family in *Brachypodium distachyon*." *BMC Genomics* 13(1):1.
- Trivellini, Alice, Giacomo Cocetta, Donald A. Hunter, Paolo Vernieri, and Antonio Ferrante. 2016. "Spatial and Temporal Transcriptome Changes Occurring during Flower Opening and Senescence of the Ephemeral Hibiscus Flower, *Hibiscus Rosa-Sinensis*." *Journal of Experimental Botany* 67(20):5919–31.
- Tsanakas, Georgios F., Maria E. Manioudaki, Athanasios S. Economou, and Panagiotis Kalaitzis. 2014. "De Novo Transcriptome Analysis of Petal Senescence in *Gardenia jasminoides* Ellis." *BMC Genomics* 15(1):1–15.
- U.S. Dept. of Agriculture. 2019. "National Agricultural Statistics Service - Floriculture Crops 2018 Summary." (ISSN: 1949-0917):89.
- Uauy, Cristobal, Juan Carlos Brevis, and Jorge Dubcovsky. 2006. "The High Grain Protein Content Gene *Gpc-B1* Accelerates Senescence and Has Pleiotropic Effects on Protein Content in Wheat." *Journal of Experimental Botany* 57(11):2785–94.
- Ülker, Bekir, M. Shahid Mukhtar, and Imre E. Somssich. 2007. "The WRKY70 Transcription Factor of *Arabidopsis* Influences Both the Plant Senescence and Defense Signaling Pathways." *Planta* 226(1):125–37.
- Ülker, Bekir and Imre E. Somssich. 2004. "WRKY Transcription Factors: From DNA Binding towards Biological Function." *Current Opinion in Plant Biology* 7(5):491–98.
- Vandenbussche, Michiel, Pierre Chambrier, Suzanne Rodrigues Bento, and Patrice Morel. 2016. "Petunia, Your Next Supermodel?" *Frontiers in Plant Science* 7(February):1–11.
- Villarino, Gonzalo H., Aureliano Bombarely, James J. Giovannoni, Michael J. Scanlon, and Neil S. Mattson. 2014. "Transcriptomic Analysis of *Petunia hybrida* in Response to Salt Stress Using High Throughput RNA Sequencing" edited by W. Arthofer. *PLoS ONE* 9(4):e94651.
- Vlot, A. Corina, D'Maris Amick Dempsey, and Daniel F. Klessig. 2009. "Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease." *Annual Review of Phytopathology* 47(1):177–206.
- Wagstaff, Carol, Thomas J. W. Yang, Anthony D. Stead, Vicky Buchanan-Wollaston, and Jeremy A. Roberts. 2009. "A Molecular and Structural Characterization of Senescing *Arabidopsis* Siliques and Comparison of Transcriptional Profiles with Senescing Petals and Leaves." *Plant Journal* 57(4):690–705.
- Waltz, Emily. 2016. "CRISPR-Edited Crops Free to Enter Market, Skip Regulation." *Nature Biotechnology* 34(6):582–582.
- Wang, Hong, Xiaoxiao Chang, Jing Lin, Youhong Chang, Jen Chih Chen, Michael S. Reid, and Cai Zhong Jiang. 2018. "Transcriptome Profiling Reveals Regulatory Mechanisms Underlying Corolla Senescence in *Petunia*." *Horticulture Research* 5(1):1–13.
- Wang, Zhuoyu and Fenny Dane. 2013. "NAC (NAM/ATAF/CUC) Transcription Factors in Different Stresses and Their Signaling Pathway." *Acta Physiologiae Plantarum* 35(5):1397–1408.
- Wasternack, C. 2007. "Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development." *Annals of Botany* 100(4):681–97.
- Weaver, L. Michael and Richard M. Amasino. 2001. "Senescence Is Induced in Individually Darkened *Arabidopsis* Leaves, but Inhibited in Whole Darkened Plants." *Plant Physiology* 127(3).
- Weaver, Louis M., Susheng Gan, Betania Quirino, and Richard M. Amasino. 1998. "A Comparison of the Expression Patterns of Several Senescence-Associated Genes in Response to Stress and Hormone Treatment." *Plant Molecular Biology* 37(3):455–69.
- Winter, Debbie, Ben Vinegar, Hardeep Nahal, Ron Ammar, Greg V. Wilson, and Nicholas J. Provart. 2007. "An 'Electronic Fluorescent Pictograph' Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets" edited by I. Baxter. *PLoS ONE* 2(8):e718.
- Woo, Hye Ryun, Hyo Jung Kim, Pyung Ok Lim, and Hong Gil Nam. 2019. "Leaf Senescence: Systems and Dynamics Aspects." *Annual Review of Plant Biology* 70(1):347–76.
- Woo, Hye Ryun, Hyo Jung Kim, Hong Gil Nam, and Pyung Ok Lim. 2013. "Plant Leaf Senescence and Death



- Regulation by Multiple Layers of Control and Implications for Aging in General." *Journal of Cell Science* 126(21):4823–33.
- Wu, Anhui, Annapurna Devi Allu, Prashanth Garapati, Hamad Siddiqui, Hakan Dortay, Maria-Inés Zanor, Maria Amparo Asensi-Fabado, Sergi Munné-Bosch, Carla Antonio, Takayuki Tohge, Alisdair R. Fernie, Kerstin Kaufmann, Gang-Ping Xue, Bernd Mueller-Roeber, and Salma Balazadeh. 2012. "JUNGBRUNNEN1, a Reactive Oxygen Species-Responsive NAC Transcription Factor, Regulates Longevity in Arabidopsis." *The Plant Cell* 24(2):482–506.
- Wu, Xiao Yuan, Wei Juan Hu, Hong Luo, Yan Xia, Yi Zhao, Li Dong Wang, Li Min Zhang, Jing Chu Luo, and Hai Chun Jing. 2016. "Transcriptome Profiling of Developmental Leaf Senescence in Sorghum (*Sorghum Bicolor*)." *Plant Molecular Biology* 92(4–5):555–80.
- Xiao, Shi, Liangying Dai, Fuquan Liu, Zhilong Wang, Wen Peng, and Daoxin Xie. 2004. "COS1: An Arabidopsis Coronatine Insensitive1 Suppressor Essential for Regulation of Jasmonate-Mediated Plant Defense and Senescence." *Plant Cell* 16(5):1132–42.
- Xu, Junping, Beum-Chang Kang, Aung Htay Naing, Su-Ji Bae, Jin-Soo Kim, Hyeran Kim, and Chang Kil Kim. 2020. "CRISPR/Cas9-Mediated Editing of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase1 Enhances Petunia Flower Longevity." *Plant Biotechnology Journal* 18(1):287–97.
- Xu, Xinping, Chunhong Chen, Baofang Fan, and Zhixiang Chen. 2006. "Physical and Functional Interactions between Pathogen-Induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 Transcription Factors." *The Plant Cell* 18(5):1310–26.
- Yang, Jiading, Eric Worley, and Michael Udvardi. 2014. "A NAP-AAO3 Regulatory Module Promotes Chlorophyll Degradation via ABA Biosynthesis in Arabidopsis Leaves." *The Plant Cell* 26(12):4862–74.
- Yang, Jianchang, Jianhua Zhang, Zhiqing Wang, Qingsen Zhu, and Lijun Liu. 2002. "Abscisic Acid and Cytokinins in the Root Exudates and Leaves and Their Relationship to Senescence and Remobilization of Carbon Reserves in Rice Subjected to Water Stress during Grain Filling." *Planta* 215(4):645–52.
- Yang, So-Dam, Pil Joon Seo, Hye-Kyung Yoon, and Chung-Mo Park. 2011. "The Arabidopsis NAC Transcription Factor VNI2 Integrates Abscisic Acid Signals into Leaf Senescence via the COR / RD Genes." *The Plant Cell* 23(6):2155–68.
- Yang, Weiyuan, Juanxu Liu, Yinyan Tan, Shan Zhong, Na Tang, Guoju Chen, and Yixun Yu. 2015. "Functional Characterization of PhGR and PhGRL1 during Flower Senescence in the Petunia." *Plant Cell Reports* 34(9):1561–68.
- Yang, Xu, Cao Deng, Yu Zhang, Yufu Cheng, Qiuyue Huo, and Linbao Xue. 2015. "The WRKY Transcription Factor Genes in Eggplant (*Solanum Melongena* L.) and Turkey Berry (*Solanum Torvum* Sw.)." *International Journal of Molecular Sciences* 16(4):7608–26.
- Yin, Jing, Xiaoxiao Chang, Takao Kasuga, Mai Bui, Michael S. Reid, and Cai Zhong Jiang. 2015. "A Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, PhFBH4, Regulates Flower Senescence by Modulating Ethylene Biosynthesis Pathway in Petunia." *Horticulture Research* 2(1):1–9.
- Yoon, Hye-Kyung, Sang-Gyu Kim, Sun-Young Kim, and Chung-Mo Park. 2008. "Regulation of Leaf Senescence by NTL9-Mediated Osmotic Stress Signaling in Arabidopsis." *Molecules and Cells* 25(3):438–45.
- You, Jun, Lihua Zhang, Bo Song, Xiaoquan Qi, and Zhulong Chan. 2015. "Systematic Analysis and Identification of Stress-Responsive Genes of the NAC Gene Family in *Brachypodium distachyon*" edited by J.-H. Liu. *PLoS ONE* 10(3):1–20.
- Yu, Kun, Jianrong Wei, Qing Ma, Dan Yu, and Jiaru Li. 2009. "Senescence of Aerial Parts Is Impeded by Exogenous Gibberellic Acid in Herbaceous Perennial *Paris polyphylla*." *Journal of Plant Physiology* 166(8):819–30.
- Zhang, Haoshan, Mingming Zhao, Qihang Song, Lifeng Zhao, Geng Wang, and Chunjiang Zhou. 2016. "Identification and Function Analyses of Senescence-Associated WRKYs in Wheat." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 474(4):761–67.
- Zhang, Kewei and Su Sheng S. S. Gan. 2012. "An Abscisic Acid-AtNAP Transcription Factor-SAG113 Protein Phosphatase 2C Regulatory Chain for Controlling Dehydration in Senescing Arabidopsis Leaves." *Plant Physiology* 158(2):961–69.

- Zhang, Kewei, Rayko Halitschke, Changxi Yin, Chang Jun Liu, and Su Sheng Gan. 2013. "Salicylic Acid 3-Hydroxylase Regulates Arabidopsis Leaf Longevity by Mediating Salicylic Acid Catabolism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(36):14807–12.
- Zhang, Kewei, Xiuying Xia, Yanyan Zhang, and Su Sheng Gan. 2012. "An ABA-Regulated and Golgi-Localized Protein Phosphatase Controls Water Loss during Leaf Senescence in Arabidopsis." *Plant Journal* 69(4):667–78.
- Zhang, Wei Yang, Yong Chao Xu, Wen Lan Li, Long Yang, Xun Yue, Xian Sheng Zhang, Xiang Yu Zhao, and Tianzhen Zhang. 2014. "Transcriptional Analyses of Natural Leaf Senescence in Maize" edited by T. Zhang. *PLoS ONE* 9(12):e115617.
- Zhang, Yongqiang, Zhongjuan Liu, Xiaoyun Wang, Jianfeng Wang, Kai Fan, Zhaowei Li, and Wenxiong Lin. 2018. "DELLA Proteins Negatively Regulate Dark-Induced Senescence and Chlorophyll Degradation in Arabidopsis through Interaction with the Transcription Factor WRKY6." *Plant Cell Reports* 37(7):981–92.
- Zhang, Yuanji and Liangjiang Wang. 2005. "The WRKY Transcription Factor Superfamily: Its Origin in Eukaryotes and Expansion in Plants." *BMC Evolutionary Biology* 5:1–12.
- Zhang, Yuelin and Xin Li. 2019. "Salicylic Acid: Biosynthesis, Perception, and Contributions to Plant Immunity." *Current Opinion in Plant Biology* 50:29–36.
- Zhao, D., A. P. Derkx, D. C. Liu, P. Buchner, and M. J. Hawkesford. 2015. "Overexpression of a NAC Transcription Factor Delays Leaf Senescence and Increases Grain Nitrogen Concentration in Wheat." *Plant Biology* 17(4):904–13.
- Zhao, Fengli, Jianhui Ma, Libei Li, Shuli Fan, Yaning Guo, Meizhen Song, Hengling Wei, Chaoyou Pang, and Shuxun Yu. 2016. "GhNAC12, a Neutral Candidate Gene, Leads to Early Aging in Cotton (*Gossypium Hirsutum* L)." *Gene* 576(1):268–74.
- Zhao, Hui Fang, Kai Qiu, Guo Dong Ren, Yong Zhu, and Ben Ke Kuai. 2010. "A Pleiotropic Phenotype Is Associated with Altered Endogenous Hormone Balance in the Developmentally Stunted Mutant (Dsm1)." *Journal of Plant Biology* 53(1):79–87.
- Zhou, Xiang, Yanjuan Jiang, and Diqiu Yu. 2011. "WRKY22 Transcription Factor Mediates Dark-Induced Leaf Senescence in Arabidopsis." *Molecules and Cells* 31(4):303–13.
- Zhou, Yong, Weifeng Huang, Li Liu, Taiyu Chen, Fei Zhou, and Yongjun Lin. 2013. "Identification and Functional Characterization of a Rice NAC Gene Involved in the Regulation of Leaf Senescence." *BMC Plant Biology* 13(1):1–13.